

На правах рукописи

**Катаева
Любовь Владимировна**

**МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ МИКРОПАРАЗИТОЦЕНОЗА ПРИ
ИНФЕКЦИОННО-ИНВАЗИОННОМ ПРОЦЕССЕ**

03.02.03 – микробиология
03.02.11 - паразитология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Тюмень - 2020

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Научный консультант:

доктор медицинских наук,
профессор

Степанова Татьяна Федоровна

Официальные оппоненты:

Рудаков Николай Викторович – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное бюджетное учреждение науки «Омский научно-исследовательский институт природно-очаговых инфекций» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, директор

Червинец Вячеслав Михайлович - доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тверской государственной медицинской академии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии, заведующий кафедрой

Бычков Виталий Григорьевич - доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра патологической анатомии и судебной медицины, профессор кафедры

Ведущая организация: Федеральное бюджетное учреждение науки «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Защита состоится «__» ____ 20__ г. в «__» часов на заседании диссертационного совета Д208.046.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, д.10, <http://www.gabrich.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 20__ года

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор

Ольга Юрьевна Борисова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Кишечная микробиологическая система является одной из основных гомеостатических систем организма, дисбаланс которой становится патогенетическим звеном многих соматических и инфекционных заболеваний. При этом кишечный гомеостаз непосредственно зависит от качественного и количественного содержания нормальной микробиоты, имеющей большое функциональное значение (Алешкин А. В., 2015). Паразитирование гельминтов в организме хозяина вызывает патологические изменения тканей и органов, которые проявляются воспалительной реакцией и нарушением микробиоценоза кишечника, причем, при большей интенсивности инвазии отмечена более высокая степень дисбиоза (Степанова Т. Ф., 2002). Изменения нормофлоры в структуре микробиоценоза толстой кишки, отягощающая роль отдельных групп условно-патогенных микроорганизмов, их значение в патогенезе паразитарных инвазий не определены, вместе с тем эти сведения важны при лечении и дальнейшей реабилитации пациентов. В настоящее время не исследованными остаются взаимоотношения условно-патогенных бактерий и гельминтов в организме окончательного хозяина, что актуализирует необходимость изучения влияния микропаразитоценоза на формирование дисбиоза толстой кишки при инфекционно-инвазионном процессе.

Микробиоценоз промежуточных хозяев *Opisthorchis felineus* – моллюсков семейства *Bithyniidae* и рыб семейства *Cyprinidae* практически не исследовался, при этом в их организме могут накапливаться микроорганизмы – потенциальные возбудители заболеваний человека и животных (Беэр С. А., 2005; Штыкова Ю. П., 2013). Исследования закономерностей функционирования микропаразитоценоза позволят определить патогенетические механизмы воздействия паразита на организм хозяина. Изучение микропаразитоценоза с позиций молекулярно-генетических исследований в разрезе микробиологических аспектов важно для рациональной профилактики инфекций и инвазий, представляющих чрезвычайно актуальную проблему.

Снижение риска передачи кишечных патогенов должно опираться на своевременные профилактические мероприятия, основанные на оценке качества водных объектов и рыбной продукции по микробиологическим показателям. Для оптимизации биологической безопасности водных биотопов необходимо изучение их микробиоценоза, в частности циркуляции бактерий рода *Aeromonas*. В развитии инфекции, связанной с *Aeromonas spp.*, опасность для человека представляют контаминированные аэромонадами рыбная продукция и вода (Хомякова Т. И., 2006; Канаева Т. И. и др., 2009; Janda J. M. et al., 2010; Камалов А. А. и др., 2015). Это обусловило характер исследований по обоснованию значимости бактерий рода *Aeromonas* в качестве санитарно-показательных микроорганизмов. Выше изложенное предопределило тематическую направленность исследований, раскрывающих механизмы межмикробного взаимодействия нормофлоры с условно-патогенными бактериями толстой кишки при паразитарных инвазиях и изысканию новых подходов для дальнейших

исследований по минимизации осложнений воспалительного характера после дегельминтизации пациентов.

Степень разработанности темы исследования

Большой вклад в изучение взаимодействия патогенных бактерий и их влияние на организм хозяина внесли работы И. И. Мечникова (1908). Ему принадлежат исследования по взаимодействию микробов между собой и с организмом хозяина, об антагонизме паразитов и других симбионтов, а также о синергическом влиянии кишечной инфекции на микрофлору кожи, роли гельминтов в качестве агентов, «открывающих ворота» патогенным микроорганизмам в ткани хозяина (Бондаренко В. М. с соавт., 2008).

Понятие «паразитоценоз» сформулировал Е. Н. Павловский (1946), определяя его как совокупность живых существ и бактериальных организмов, обитающих в организме хозяина. Он указал, что теорию паразитоценозов следует применять не только в клинике для уточнения диагноза и причин индивидуального течения болезни, но при паразитолого-экологическом исследовании путей циркуляции возбудителей болезни в ее очаге. Таким образом, Е. Н. Павловским было сформулировано новое научное направление – экологическая и краевая паразитология и разработано учение о природной очаговости болезней (1965). Позднее В. Н. Беклемишевым (1970) обоснована самостоятельная дисциплина - медицинская паразитология. Наиболее четко экологическое понимание сущности паразитизма было сформулировано В. А. Догелем (1947, 1962) и К. Кеннеди (1978), которые в рамках экологической паразитологии, установили зависимость инвазированности животных от условий окружающей среды и физиологического состояния организма хозяев.

Развивая общую концепцию паразитизма, А. П. Маркевич (1982) предложил новую дисциплину общепаразитологического уровня – паразитоценологию и определил ее как науку об объективных закономерностях существования экопаразитарных систем, а также популяций свободных стадий паразитов и других симбионтов, входящих в состав конкретного биогеоценоза или биосферы в целом. Совокупность патогенных возбудителей в одной особи хозяина А. П. Маркевич (1985) определил как микропаразитоценоз.

Онтогенез гельминтов, происходящий в организме как промежуточных, так и окончательных хозяев - это комплексный процесс, зависящий в значительной мере от структуры микробиоценоза (микропаразитоценоза). Первые исследования в области микропаразитоценоза при описторхозной инвазии проведены в Тюменском научно-исследовательском институте краевой инфекционной патологии под руководством Г. В. Кондинского. Изучены взаимовлияния марит *O. felineus* и бактерий *Salmonella typhi* при их совместном культивировании. Исходя из положений теории симбиогенеза, высказано предположение о наличии симбионтных микроорганизмов у марит *O. felineus*. Г. В. Кондинский с соавторами (1984, 1985, 1987) исследовали микробиоту марит и метацеркарий *O. felineus*. В дальнейшем изучалось распределение бактерий в желчи и кишечном содержимом у пациентов при различных формах описторхозной инвазии. Показана существенная роль микробиоты желчевыводящих путей и толстой кишки при разных формах инвазионного процесса при описторхозе (Степанова Т.

Ф. и др., 2002, 2005). В комплекс клинических, биохимических и иммунологических тестов при обследовании пациентов, страдающих паразитозами, предложено включить бактериологические методы. Известно, что гельминты как сочлены микропаразитоценоза играют значимую роль в экологических системах, и эта роль полной мере пока не раскрыта. Без глубокого понимания взаимоотношений паразитов и симбионтов с хозяевами и объектами окружающей среды, представление о явлениях паразитизма, патогенности микроорганизмов и защитных реакциях хозяев, по всей видимости, будет недостаточным. Полученные результаты могут быть использованы в микробиологической практике с целью разработки критериев и оценки качества воды открытых водоемов и рыбной продукции.

Для многих стран Европы и Азии аэромонадная инфекция, возбудителем которой являются бактерии рода *Aeromonas*, представляет серьезную проблему. Так, в структуре острых кишечных заболеваний аэромонады составляют от 1 до 13% у взрослых и до 50% у детей, кроме того, бактерии этого рода выделяются и из водных объектов (Канаева Т. И. и др., 2009.; Камалов А. А. и др., 2015; Куклина Н. Г. и др., 2017).

В наших исследованиях структура микробиоценоза как организма человека, так и промежуточных хозяев жизненного цикла *O. felineus* рассматривается с позиции микропаразитоценологии.

Цель исследования

Установление микробиологических закономерностей функционирования микропаразитоценоза при инфекционно-инвазионном процессе на модели изучения межпопуляционных взаимодействий условно-патогенных бактерий и сочленов жизненного цикла *O. felineus*.

Задачи исследования

1. Изучить микробиоценоз толстой кишки пациентов при инфекционно-инвазионном процессе, оценить комплексы генов вирулентности и кластеры О-антигенов штаммов *Escherichia coli*, изолированных от пациентов с паразитарными и воспалительными заболеваниями желудочно-кишечного тракта.

2. Исследовать межпопуляционные взаимодействия бактерий *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* с моллюсками *O. felineus* при сокультивировании их в искусственной среде (*in vitro*).

3. Определить структуру и установить сезонную динамику микробиоценоза первых промежуточных хозяев *O. felineus* - моллюсков семейства *Bithyniidae*.

4. Изучить персистентные свойства и факторы патогенности бактерий, составляющих микробиоценоз моллюсков семейства *Bithyniidae* и мест их обитания (вода водоемов, придонный грунт).

5. Оценить результаты микробиологического исследования рыб семейства *Cyprinidae* (карповых) – второго промежуточного хозяина *O. felineus*, инвазированных его личинками.

6. Обосновать роль бактерий рода *Aeromonas*, изолированных из водных объектов и мест обитания промежуточных хозяев *O. felineus*, в этиологии бактериальных инфекций человека.

Научная новизна

Установлены особенности кишечного микробиоценоза пациентов с паразитарными инвазиями и инфекциями (описторхоз, лямблиоз, токсокароз, токсоплазмоз, иксодовый клещевой боррелиоз): при лямблиозе, токсоплазмозе, токсокарозе и иксодовом клещевом боррелиозе - выраженный дефицит бактерий рода *Lactobacillus*; при описторхозе – *Bifidobacterium spp.* Определены условно-патогенные бактерии, вызывающие снижение функции колонизационной резистентности нормофлоры толстой кишки: при описторхозе, лямблиозе, токсоплазмозе и токсокарозе - бактерии рода *Klebsiella*, при иксодовом клещевом боррелиозе - бактерии рода *Proteus*. Вторые позиции принадлежали бактериям *S. aureus* и грибам рода *Candida*.

Выявлены комплексы генов вирулентности и кластеры O- и H-антигенов штаммов *E. coli*, изолированных из содержимого толстой кишки при инфекционно-инвазионном процессе, в зависимости от нозоформы. Показано влияние описторхозной инвазии на колонизацию организма человека штаммами *E. coli* - носителями кластеров генов, ассоциированных с вирулентностью, что возможно связано с нарушением иммунитета и выраженным влиянием метаболитов *O. felineus*.

Разработана новая система мониторинга патогенного потенциала энтеробактерий, позволяющая определять наличие генетических детерминант штаммов: аэробактин *iuc*, гемолизин *hly*, колибактин *clb*, способствующих вероятности возникновения и развития инфекционных заболеваний (патент на изобретение РФ № 2662930 от 31.07.2018 «Система мониторинга патогенного потенциала энтеробактерий методом полимеразной цепной реакции»).

Установлено, что обнаружение бактерий рода *Aeromonas* в клиническом материале, видовое разнообразие, выделение в монокультуре и ассоциациях, резистентность к антибиотикам доказывает их этиологическую значимость в инфекционном процессе. Филогенетический сравнительный анализ белковых спектров клинических штаммов *A. hydrophila*, *A. salmonicida*, *A. veronii* с дендрограммами штаммов аналогичных видов, выделенных из объектов окружающей среды (вода, рыба), указывает на высокую степень гомологии, что свидетельствует об их близком родстве. Вследствие чего, воду и рыбу можно рассматривать как факторы передачи при аэромонадной инфекции, а бактерии рода *Aeromonas* - в качестве критерия микробиологической оценки водных объектов и рыбной продукции.

Предложен способ определения границ природных очагов биогельминтозов, дающий возможность применять генетические маркеры и показатели индекса подобия при выявлении локализации популяции карповых рыб в водных объектах для установления пределов распространения популяции рыб на конкретной территории (патент на изобретение РФ № 2545707 от 26.02.2015 «Способ определения границ природных очагов биогельминтозов»).

Разработан способ определения источника заражения при расшифровке вспышек бактериальных инфекций, позволяющий использовать кластерный анализ протеинограмм штаммов предполагаемых возбудителей, определять их идентичность и, тем самым, устанавливать принадлежность к одному источнику

заражения (патент на изобретение РФ № 2696101 от 31.07.2019 «Способ расшифровки вспышек бактериальных инфекций и определения источника заражения»).

Выделен мультирезистентный штамм бактерий *Acinetobacter baumannii*, результаты полногеномного секвенирования которого выявили маркеры резистентности к антимикробным препаратам: аминогликозидам (aph(3^{''})-Ib; aph(6)-Id; aph(3['])-Ia; aph(3['])-Via; armA), бета-лактамам (blaOXA-23, blaOXA-66, bla ADC-73, blaTEM-ID), MLS-антибиотикам(mrs, mph), сульфонамиду (sul2), тетрациклину (tet(B)). Штамм депонирован в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» В-8561 и международной базе данных GenBank/NCBI (accession no SRR8881948), а также предложен для оценки эффективности антимикробных препаратов, дезинфицирующих средств (патент на изобретение РФ № 2711922 от 23.01.2020 «Мультирезистентный штамм бактерий *Acinetobacter baumannii* для стандартизации оценки эффективности разрабатываемых антимикробных препаратов и дезинфицирующих средств»).

Теоретическая и практическая значимость работы

Разработаны теоретические основы оценки состояния микропаразитоценоза в звене промежуточных и окончательного хозяев *O. felineus* путем внедрения новых подходов к его дифференциации. На основе комплексной оценки сходства и различия состава микробиоценоза толстой кишки человека дана его характеристика при инфекционно-инвазионных заболеваниях. Выявлены качественные и количественные особенности микробиоты: на фоне снижения аутохтонных бактерий, выполняющих функцию колонизационной резистентности толстого кишечника, отмечено возрастание аллохтонных микроорганизмов. Полученные результаты, свидетельствующие о нарушении микробиоценоза толстой кишки, обосновывают включение пробиотических препаратов в схемы лечения пациентов с паразитозами.

Получены новые данные о взаимовлиянии условно-патогенных микроорганизмов *K. pneumoniae*, *S. aureus* и продуктов жизнедеятельности мариит *O. felineus* при сокультивировании их в искусственной среде (*in vitro*), заключающиеся в том, что метаболиты мариит *O. felineus* подавляют рост и размножение этих бактерий. Экспериментально выявленные взаимодействия *K. pneumoniae*, *S. aureus* и метаболитов мариит *O. felineus* позволили теоретически обосновать особенности функционирования микропаразитоценоза в паразитарной системе и раскрыть подходы к патогенетическим механизмам воздействия паразита на организм хозяина.

Результаты исследований структуры микробиоценоза и сезонной динамики микробиоты моллюсков – первого промежуточного хозяина *O. felineus* - позволили выдвинуть и теоретически обосновать гипотезу о влиянии свойств персистенции резидентных бактерий на приживаемость яиц и дальнейшее развитие личиночных стадий гельминта в теле моллюска, что в итоге обуславливает устойчивое функционирование паразитарной системы.

Показана необходимость использования комплекса диагностических тестов при обследовании на наличие паразитарной инвазии, включающего исследование

микробиоценоза толстой кишки, определение чувствительности к антимикробным препаратам и бактериофагам (при обнаружении условно-патогенных бактерий). Это позволит провести коррекцию нарушений и будет способствовать профилактике воспалительных заболеваний желудочно-кишечного тракта, вызванных дегельминтизацией пациента. Полученные результаты исследований, выявляющие нарушения микробиоценоза толстой кишки обосновывают необходимость включения в схемы лечения паразитарной и инфекционной патологии пробиотиков на основе: *Bifidobacterium spp.* при описторхозе; бактерий рода *Lactobacillus* - лямблиозе, токсоплазмозе, токсокарозе и иксодовом клещевом боррелиозе.

Представляется целесообразным для идентификации видового разнообразия бактерии рода *Aeromonas* использовать метод масс-спектрометрии при проведении бактериологического исследования мочи, который будет способствовать улучшению диагностики возбудителей урогенитальной инфекции.

При расшифровке вспышек бактериальной инфекции и определении источника заражения определена необходимость проведения протеомного анализа подобия штаммов бактерий, изолированных из различных объектов окружающей среды и клинического материала.

Установлена контаминация бактериями рода *Aeromonas* объектов обитания (вода, придонный грунт) сочленов жизненного цикла *O. felineus* (моллюски, рыба). Определено превалирование этих бактерий в структуре микробиоты промежуточных хозяев *O. felineus*. Показано, что рыбы, инвазированные метацеркариями *O. felineus*, в большей степени подвержены обсеменению *Aeromonas spp.*, которые значительно снижают качество рыбной продукции. Эти исследования с высокой вероятностью доказывают необходимость доработки схем идентификации *Aeromonas spp.* и включения указанных бактерий в качестве критерия санитарно-гигиенической оценки объектов окружающей среды.

В Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболensk» депонированы 26 штаммов: 12 *E. coli*, изолированные из биоматериала пациентов с диагнозом описторхоз и лямблиоз, отличающиеся кластерами генов вирулентности и патогенности (В-8794, В-8789, В-8790, В-8791, В-8792, В-8793, В-8795, В-8796, В-8797, В-8798, В-8799, В-8800); 1 штамм *E. coli* В-8794, выделенный от пациента с лямблиозом, депонирован как референс-штамм нового генотипа для типирования бактерий рода *Escherichia*; 12 штаммов *Aeromonas spp.* (В-8815, В-8816, В-8817, В-8818, В-8819, В-8820, В-8821, В-8822, В-8823, В-8824, В-8825, В-8826), изолированные из воды открытых водоемов, рыб и клинического материала, отличающиеся резистентностью к антимикробным препаратам; 1 штамм *Acinetobacter baumannii* (В-8557) депонирован как природный штамм, обладающий генами резистентности к бета-лактамам – blaOXA-104 и ADC-30 и отсутствием маркеров резистентности к другим группам антибиотиков. Депонированные штаммы могут применяться для стандартизации оценки эффективности разрабатываемых перспективных антимикробных препаратов, а также в целях проведения филогенетических и молекулярно-генетических исследований.

В международном банке данных GenBank депонированы нуклеотидные последовательности 13 штаммов, носителей генов, ассоциированных с вирулентностью и резистентностью: *A. baumannii* (SRR8926368); *E. coli* (SRR11426061, SRR11426065, SRR11426066, SRR11426060, SRR11426067, SRR11426059, SRR11426064, SRR11426062, SRR11426068, SRR11426057, SRR11426058, SRR11426063), которые могут быть положены в основу разработки праймеров для создания диагностических наборов.

Сформирована рабочая коллекция штаммов, изолированных от пациентов с инфекционно-паразитарной патологией и объектов окружающей среды, которая может быть использована для изучения механизмов резистентности и штаммового разнообразия возбудителей бактериальных инфекций. Информация, содержащая сведения о локусе и месте выделения штаммов, составе и количественной характеристике, биологических свойствах, антибиотикорезистентности бактерий, включенных в рабочую коллекцию, оформлена в электронном виде (Excel).

Результаты исследований функционирования микропаразитоценозов при инфекционно-инвазионном процессе внедрены в образовательный процесс кафедры микробиологии ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Минздрава России (акт внедрения от 29.01.2020 г.) и ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Тюменской области (акт внедрения от 15.01.2020 г.) как региональный компонент медицинской паразитологии. Материалы диссертации вошли в дополнительные образовательные программы повышения квалификации и профессиональной переподготовки врачей на базе ФБУН «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по специальности «Бактериология» (акт внедрения от 13.01.2020 г.).

Методология и методы исследования

При проведении исследований исходили из положений классической микробиологии, изучающей теоретические основы жизнедеятельности микроорганизмов: закономерности взаимоотношения с окружающей средой и живыми организмами, распространения в природе. Аспекты взаимодействия популяций паразита и хозяина изучались в соответствии с достижениями современной паразитологии, с позиций положения о саморегулирующихся хозяинно-паразитарных экосистемах. Для выполнения поставленных задач были использованы микробиологические (бактериологические, биологические, масс-спектрометрические), молекулярно-генетические (полногеномное секвенирование, филогенетический анализ), паразитологические и статистические методы исследования. Манипуляции с лабораторными экспериментальными животными производились по правилам гуманного обращения в соответствии с заключением комиссии по биоэтике ФБУН ТНИИКИП Роспотребнадзора и принципам, изложенным в Рекомендациях Европейской Комиссии (протокол от 03.03.2016 г.).

Штаммы микроорганизмов

В работе использованы штаммы микроорганизмов, выделенные от пациентов с паразитарными инвазиями и инфекциями (289); выделенные при изучении микробиоценоза моллюсков и рыб – промежуточных хозяев *O.felineus* (937); из объектов окружающей среды (186).

Клинические образцы материала

Материал от пациентов с установленным диагнозом паразитарной инвазии получали в клиническом отделении Федерального бюджетного учреждения науки «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Роспотребнадзора.

Сбор материала и бактериологическое исследование содержимого толстой кишки проведено в группах пациентов с диагнозом: описторхоз, лямблиоз, токсоплазмоз, токсокароз, иксодовый клещевой боррелиоз (ИКБ) в соответствии с требованиями с Отраслевым стандартом «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника», 2003 г.

Гельминты, животные

Экспериментальную модель описторхоза создавали на 5 золотистых хомяках *Mesocricetus auratus* самцах массой 76,1±3,3 грамма. При выполнении экспериментов соблюдались все правила работы с лабораторными животными: Директива Европейского парламента и совета европейского союза по охране животных, используемых в научных целях, в соответствии с нормативными требованиями Российской Федерации. Мариты *O. felineus* (60 экземпляров) получали из печени золотистых хомяков, инвазированных метацеркариями.

Микропаразитоценоз пресноводных переднежаберных моллюсков семейства *Bithyniidae* – первого промежуточного хозяина *O. felineus* изучен на 153 особях. Сбор моллюсков производился на реке Ирьюм (90 особей), протекающей по территории Курганской и Тюменской областей, в Амурской области – на реке Амур (63 особи).

Исследовано 84 экземпляра рыб, выловленных из Обь-Иртышского водного бассейна. Изучали зараженность метацеркариями *Opisthorchis felineus* трех видов рыб семейства *Cyprinidae* в возрасте от 1+ до 7+ лет: язь *Leuciscus idus* (Linnaeus, 1758), плотва сибирская *Rutilus rutilus lacustris* (Linnaeus, 1758), уклея *Alburnus alburnus* (Linnaeus, 1758). До проведения исследования рыба хранилась при температуре плюс 4-6° С в течение 2-3 суток. Из всех исследованных экземпляров рыб изолировано 154 культуры микроорганизмов, выделенных с поверхности тела и внутренностей рыб.

Метацеркарии *O. felineus* – 250 личинок, получали из рыбы (язь *Leuciscus idus* (Linnaeus, 1758)).

Объекты окружающей среды

Воду и придонный грунт отбирали из мест обитания моллюсков. Исследовано 15 проб воды открытых водоемов и 9 проб придонного грунта. Пробы воды открытых водоемов - 22 и 118 проб лечебной грязи, добываемой в озерах Тюменского района.

Микробиологические методы исследования

Изучение кишечного микробиоценоза проводили в соответствии с Федеральными клиническими рекомендациями «Определение дисбиотических изменений желудочно-кишечного тракта по маркерам содержимого кишечника», 2016. Количественную оценку содержания КОЕ/1 г фекалий и характеристику степени микробиологических нарушений давали в соответствии с Отраслевым стандартом «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника», 2003 г. Выделение штаммов осуществлялось общепринятыми методами (Приказ МЗ СССР от 22.04.1985 № 535). Идентификация выделенных бактерий проведена на бактериологическом анализаторе (Sensititre ARIS 2X, Великобритания) и по прямому белковому профилированию с помощью времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией с использованием MALDI-TOF MS серии Microflex LT с программным обеспечением Maldi BioTyper 3,0 (Bruker Daltonics, Германия).

Изучение факторов вирулентности бактерий - гемолизина, лецитиназы, плазмокоагулазы и лизоцима, исследованы у 154 штаммов (М. О. Биргер, 1982).

Изучение свойств персистенции бактерий. Антилизоцимная активность (АЛА) и биопленкообразование (БПО) бактерий исследованы у 160 штаммов бактерий, выделенных из моллюсков и 11 – выделенных из среды их обитания. АЛА определяли по методике Бухарина О.В. с соавт., БПО микроорганизмов исследовали по G.O. Pool (2000) фотометрическим методом на фотометре Elix808 (BioTech, США).

Определение чувствительности к антибиотикам проводилось на бактериологическом анализаторе Sensititre (Trek Diagnostic Systems, Великобритания) по минимальной ингибирующей концентрации и диско-диффузионным методом (МУК 4.2.1890-04).

Исследование микробиоценоза моллюсков, рыб, метацеркарий *O. felineus*. Моллюсков и метацеркарии многократно отмывали стерильной водопроводной водой, затем гомогенизировали, высевали на плотные (Эндо, МПА, кровяной агар, Сабуро) и в жидкие (тиогликолевая) питательные среды. Микробиологические исследования рыбы проводились по МУК 4.2.2046-06.

Исследование объектов окружающей среды. Для анализа микробиологического состава водной среды использовался титрационный метод. Пробы воды высевали в количестве 50 мл в жидкую питательную среду накопления ЛПС (лактозо-пептонная среда) и через 48 ч инкубации при 37°С высевали на среду Эндо. Чашки с посевами инкубировали при температуре 37°С в течение 18 - 24 ч. Колонии отвивали и идентифицировали (МУК 4.2.2794-10) Пробы придонного грунта водоемов и лечебной грязи исследовали в соответствии с МУК 4.2.2793-10; МР № ФЦ/4022; МУ № 142-9/316-17.

Молекулярно-генетические методы исследования

Проведены на штаммах *Escherichia coli*, выделенных от пациентов с паразитарными инвазиями и заболеваниями ЖКТ воспалительного характера.

Выделение тотальной ДНК из бактериальной культуры. 2-3 петли культуры переносили в микроцентрифужную пробирку «Eppendorf» с 400 мкл буферного раствора 1×TE (10 mM Tris, pH 8,0 и 1 mM EDTA), добавляли 50 мкл

лизоцима (10мг/мл) и инкубировали в течение двух часов при 37°C. К полученной суспензии добавляли 75 мкл раствора SDS/протеиназа К (70 мкл 10% SDS и 5 мкл протеиназы К), 100 мкл 5М NaCl и 100 мкл раствора СТАВ/NaCl (4,1 г NaCl, 10 г СТАВ, 80 мл дистиллированной воды). Полученную смесь трясали до молочно-белой консистенции и инкубировали в течение 10 мин при 65°C. После инкубации в пробирку добавляли 750 мкл хлороформ/изоамиловый спирта (24:1), трясали 10 с и центрифугировали при 14000 об/мин в течение 5 мин. Надосадочную жидкость, содержащую ДНК, отбирали в новую пробирку, добавляли 450 мкл изопропилового спирта и инкубировали в течение 10 мин на льду. Центрифугировали 15 мин при комнатной температуре при 14000 об/мин и супернатант удаляли. К осадку добавляли 1 мл 70% перегнанного этанола и центрифугировали в течение 15 мин при +4°C при 12000 об/мин. Супернатант удаляли, осадок высушивали при комнатной температуре и растворяли в 20 мкл дистиллированной воды.

Полногеномное секвенирование штаммов *E. coli* осуществлено на платформе Illumina MiSeq, с использованием наборов Nextera DNA Library Preparation Kit и MiSeq Reagent Kits v3 (600-Cycle Kit), согласно рекомендациям производителя. Полученные единичные прочтения полногеномного секвенирования для каждого штамма *E. coli* были собраны в контиги при помощи программы Unicycler v.0.4.7.

Филогенетический анализ проводили с использованием программы Wombac 2.0 (<http://www.bioinformatics.net.au/software.wombac.shtml>) Для построения филогенетического дерева использовали программу SplitsTree4 (<http://www.splitstree.org/>). С помощью программы Mauve (<http://gel.ahabs.wisc.edu/mauve/>) определена последовательность гена 16S рРНК.

Определение серогруппы осуществляли с использованием сервера SerotypeFinder 3.0 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/SerotypeFinder/>), программы Mauve (<http://gel.ahabs.wisc.edu/mauve/>), Lasergene и рабочие базы данных для определения серогрупп *E. coli* ОКК ФБУН ГНЦ ПМБ.

Определение генов вирулентности. Использовали сервер VirulenceFinder 2.0 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/VirulenceFinder/>).

Паразитологические методы исследования

Ихтиопаразитологические методы. Выделения метацеркарий *Opisthorchis felineus* осуществляли в соответствии с п. 3.2.11.4. МУК 3.2.988-00.

Малакологические методы: Определение видов моллюсков; выявления личинок (церкарий) паразита *O. felineus* в моллюсках проводили методом прижизненной диагностики (С. А. Безр, 2005).

Метод биологической пробы. Заражение золотистых хомячков осуществлялось перорально жизнеспособными метацеркариями *O. felineus* (50 на особь), выделенными из язей методом переваривания в искусственном желудочном соке. Повторное заражение проводили через 3 суток, дополнительно 50 метацеркариями (п.5.6. МУК 3.2.988-00).

Метод неполного гельминтологического вскрытия млекопитающих. Для получения марит *O. felineus* применялась методика неполного гельминтологического вскрытия отдельных органов животных по К.И. Скрыбину. Золотистых хомячков вскрывали, извлекали печень, желчный пузырь и

поджелудочную железу помещали в чашку Петри. Печень разминали руками, доливали физиологический раствор и оставляли стоять 20-30 мин, паразиты выходили из желчных протоков печени и оседали на дно.

Методика сокультивирования бактерий с маритами *O. felineus*. Паразитов помещали в теплый стерильный физиологический раствор и осуществляли 10-кратную отмывку. В стерильные бактериологические пробирки наливали по 10 мл питательной среды 199 и помещали по 12 экземпляров марит в каждую. Бактериальную суспензию готовили из суточных агаровых культур ($1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл). Готовую суспензию бактерий (1 мл) вносили в пробирки со средой и маридами. Сформировали 2 опытные группы: 1) питательная среда 199, марида и бактерии *K. pneumoniae*; 2) питательная среда 199, марида и бактерии *S. aureus*; и 3 группы контрольные: 1) питательная среда 199 и бактерии *K. pneumoniae*; 2) питательная среда 199 и бактерии *S. aureus*; 3) питательная среда 199 и марида *O. felineus*. Ежедневно из пробирок опытных и контрольных групп высевали культуры на чашки со средой Левина в двойной повторности из разведения 10^5 по 0,1 мл. Исследовали биохимические свойства культур, факторы патогенности, чувствительность к антибиотикам. Параллельно изучали физиологические свойства марит и регистрировали количество жизнеспособных и погибших экземпляров. Физиологическое состояние гельминтов оценивали по жизнеспособности, подвижности, наличию яиц в питательной среде. Нежизнеспособными (погибшими) считали марида, у которых отмечалось отсутствие двигательной активности и прекращение моторики кишечника. Наличие яиц в пробирке с питательной средой определяли микроскопией осадка (центрифугирование содержимого после удаления из пробирки марит при 3000 оборотов в течение 5 мин). Подсчет количества выделившихся яиц производили в камере Горяева. Оценку физиологического состояния гельминтов и жизнеспособность бактерий производили в 24 – часовом интервале в течение 10 суток.

Статистические методы исследования

Статистическую обработку материала осуществляли в компьютерной оболочке Windows с помощью процессора электронных таблиц Microsoft Office Excel 2003 и программы «Биостат» с вычислением показателей: средней арифметической (M), средней ошибки средней величины (m), коэффициента корреляции (r). Использовались непараметрические методы с применением критерия Манна-Уитни и параметрические – t-критерия Стьюдента. Разница между сравниваемыми величинами считалась достоверной при значении $p < 0,05$. Для установления связи между параметрами использовали метод ранговой корреляции по Спирмену. Результаты статистически обработаны с использованием методов вариационной статистики в программах Biostat, Microsoft Office Excel, SPSS Statistics 17.0. Кластерный анализ биологических свойств микросимбионтов – с использованием стандартной программы «Maldi BioTyper 3,0»

Личное участие автора в получении результатов

Личный вклад автора состоит в участии во всех этапах выполнения диссертационной работы: в определении и формулировании цели и задач, сборе и

исследований водных объектов, рыбной продукции с целью идентификации бактерий рода *Aeromonas*.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов, представленных в диссертации, обеспечивается достаточным объемом, использованием общепринятых и современных лабораторных методов исследований, корректным анализом и интерпретацией полученных результатов, статистической обработкой данных. Исследовано 811 микробиоценозов толстой кишки пациентов с паразитарными инвазиями и инфекциями; 248 объектов окружающей среды (вода открытых водоемов, придонный грунт, лечебная грязь); микробиоценоз промежуточных хозяев возбудителя описторхоза изучен у 153 особей. Выделено 1412 штаммов бактерий, изучен состав и свойства персистенции условно-патогенных микросимбионтов, в том числе бактерий рода *Aeromonas*. Применялись следующие методы исследования: классический бактериологический, масс-спектрометрический, молекулярно-генетические (полногеномное и мультилокусное секвенирование, филогенетический анализ), микробиологические методы исследования объектов окружающей среды, экспериментальные исследования на животных, паразитологические (ихтиопаразитологические, малакологические, метод неполного гельминтологического вскрытия млекопитающих и сокультивирования бактерий с маритами гельминта).

Работа выполнена в соответствии с планом научных работ Федерального бюджетного учреждения науки «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Роспотребнадзора (тема №060 «Исследование функционирования паразитарной системы описторхоза: микросимбиотические, популяционно-генетические аспекты, особенности при смене хозяев, антропопрессии») на 2016-2020 гг., номер государственной регистрации АААА-А16-116022610096-6 от 26.02.2016 г. Исследования проведены на оборудовании, имеющем сертификаты качества, свидетельства и аттестаты о метрологической поверке.

Апробация диссертации проведена на заседании Ученого совета Федерального бюджетного учреждения науки «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Роспотребнадзора (протокол № 1 от 23.01.2020 г).

Основные положения диссертации и материалы исследований доложены на научно-практических конференциях: IX Всероссийском научно-практическом обществе эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (Москва, 2007 г.); Межрегиональной научно-практической конференции, посвященной 85-летию образования государственной санитарно-эпидемиологической службы Российской Федерации (Тюмень, 2007 г.); Всероссийской конференции «Актуальные аспекты паразитарных заболеваний в современный период» (Тюмень, 2008 г.); X съезде Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов «Итоги и перспективы обеспечения эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации» (Москва, 2012 г.); Межрегиональной научно-практической конференции, посвященной 90-летию образования государственной санитарно-

эпидемиологической службы Российской Федерации (Тюмень, 2012 г.); Всероссийской конференции «Актуальные аспекты паразитарных заболеваний в современный период» (Тюмень, 2013 г.); VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика - 2014» (Издательство МБА", 2014 г.); Российской научно-практической конференции в связи с 50-летием со дня организации Тюменского научно-исследовательского института краевой инфекционной патологии «Итоги и перспективы изучения проблем инфекционных и паразитарных болезней» (Тюмень, 2015 г.); VII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии и гигиены» (С-Петербург, 2015 г.); IV национальном конгрессе бактериологов и международном симпозиуме «Микроорганизмы и биосфера «MICROBIOS-2018» (Омск, 2018 г.); Симпозиуме «Профилактическая медицина основа здравоохранения. Актуальные вопросы анализа риска при обеспечении санитарно-эпидемиологического благополучия населения». X юбилейном терапевтическом форуме (Тюмень, 2018 г.); Симпозиуме «Профилактическая медицина – основа здравоохранения. Актуальные вопросы обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения» (Тюмень, 2019 г.).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 46 печатных работ, из них 19 статей в рецензируемых изданиях, 7 статей в других изданиях, 16 публикаций в материалах конференций, 4 патента на изобретения РФ.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 256 страницах, написана по традиционному плану, состоит из введения, пяти глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспективы дальнейшей разработки темы, списка сокращений, списка литературы, приложения. Библиографический указатель включает 313 источников: 193 отечественных и 120 зарубежных. Текст иллюстрирован 28 таблицами и 46 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Видовой состав и структура кишечного микробиоценоза при паразитарных инвазиях

Исследование микробиоценоза содержимого толстой кишки пациентов с описторхозом показало, что среди исследуемых представителей нормофлоры, чаще всего регистрируется дефицит бактерий рода *Bifidobacterium spp.*, затем, *Lactobacillus spp.*, в меньшей степени выражен дефицит *Enterococcus spp.* и *E. coli*. На фоне снижения содержания ниже нормы *E. coli* с нормальной ферментативной активностью отмечается повышенное выделение *E. coli* (Lac-) и *E. coli* (Gem+) - $6,9 \pm 7,5\%$ и $16,2 \pm 7,5\%$ соответственно. Частота обнаружения других представителей семейства *Enterobacteriaceae* составила $35,14 \pm 6,6\%$, чаще идентифицировались бактерии рода *Klebsiella* – в $19,6 \pm 7,4\%$ случаев. Грибы рода *Candida* идентифицировались в $8,1 \pm 7,8\%$ случаев, *S. aureus* – $15,5 \pm 7,5\%$.

Сравнительный анализ микробиоты толстой кишки пациентов с описторхозом, проживающих в г. Тюмени и в гиперэндемичных по этой инвазии районах Тюменской области, показал, что наибольшие изменения приходятся на автохтонную микрофлору – бактерии родов *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* и *E. coli* (Рисунок 1) При этом статистически значимые различия ($p < 0,001$) регистрируются только по *Bifidobacterium spp.*

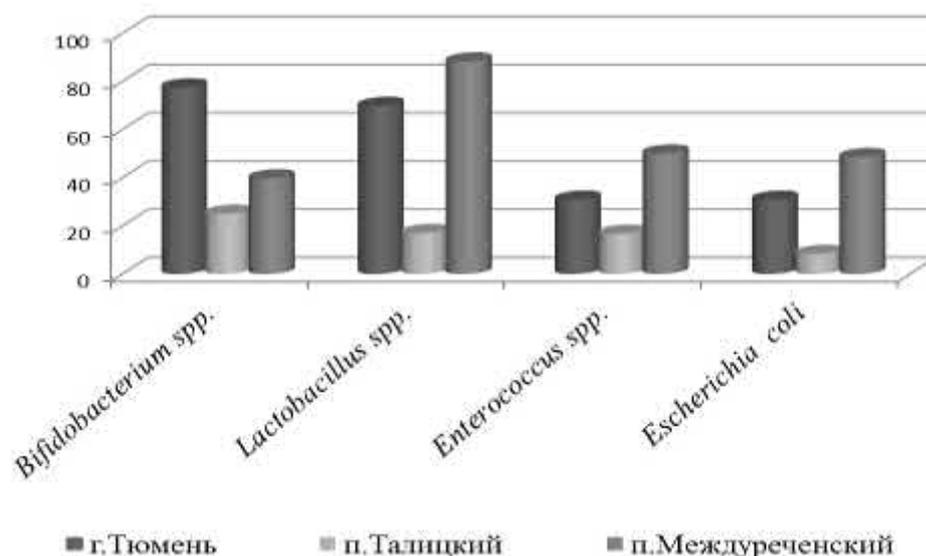


Рисунок 1 - Сравнительная характеристика дефицита нормофлоры толстой кишки у пациентов с описторхозом (%), проживающих в г. Тюмени и гиперэндемичных районах

Состав нормофлоры толстой кишки у пациентов с лямблиозной инвазией, характеризуется более выраженным дефицитом бактерий рода *Lactobacillus*, снижение количества которых колеблется от $68,52 \pm 3,08\%$ до $80,95 \pm 2,6\%$ у детей и взрослых. Статистически значимых различий по указанному показателю в различных возрастных группах не выявлено. Более выраженное снижение количества бактерий рода *Bifidobacterium* отмечается у детей до 3-х лет и взрослых, а наименьший показатель регистрируется в возрастной группе от 8 до 14 лет, при этом, различия статистически достоверны, $p < 0,02$. Снижение количества *E. coli* с нормальной ферментативной активностью колеблется от $24,1 \pm 4,9\%$ до $37,5 \pm 5,2\%$, статистически достоверных возрастных особенностей по этому показателю не отмечено. Дефицит бактерий рода *Enterococcus* более выражен в возрасте 8 - 30 лет и менее всего в группе детей до 3-х лет, различия статистически достоверны, $p < 0,01$ и $p < 0,05$ соответственно. У пациентов с лямблиозом во всех возрастных группах дефицит *E. coli* с нормальной ферментативной активностью коррелирует с дефицитом *Enterococcus spp.* Вместе с тем, снижение количества *Bifidobacterium spp.* находится в обратной зависимости от содержания в кишечнике *Enterococcus spp.* и *E. coli*, за исключением детей старшего возраста (Рисунок 2).

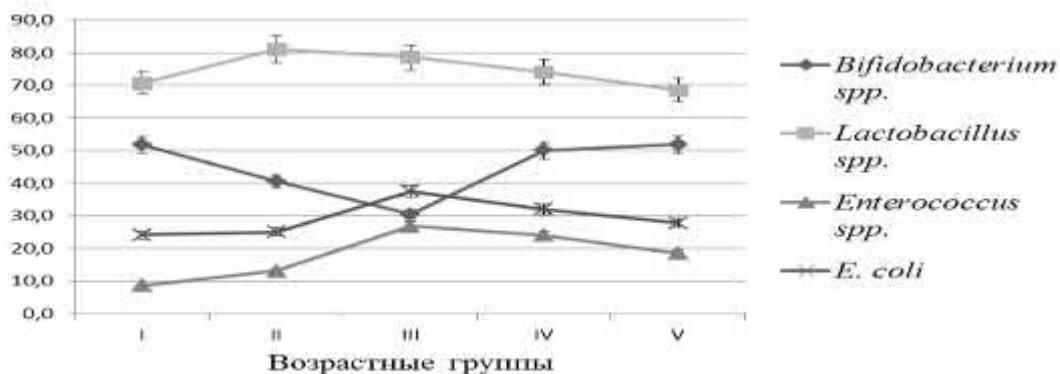


Рисунок 2 - Характеристика дефицита некоторых представителей нормофлоры толстой кишки у пациентов с лямблиозом, %

Частота обнаружения в содержимом толстой кишки у пациентов с лямблиозом *E. coli* (Lac-) и *E. coli* (Gem+) в группе детей 8 – 14 лет составила наименьшее значение, наибольший показатель зарегистрирован в группе пациентов 15 – 30 лет, различия статистически значимы, $p < 0,05$.

Среди бактерий семейства *Enterobacteriaceae* чаще идентифицировались бактерии родов *Klebsiella*, *Enterobacter* и *Citrobacter*, частота обнаружения их в возрастных группах отличалась незначительно, различия статистически не достоверны. Вместе с тем, суммированная высеваемость бактерий семейства *Enterobacteriaceae* (без *E. coli*), показала, что у детей до 7 лет, она достоверно выше ($p < 0,05$) по сравнению с детьми старше 7 лет и взрослых.

Статистически достоверные различия у детей и взрослых отмечаются по частоте обнаружения *S. aureus*. У детей до 14 лет высеваемость их была значительно выше по сравнению с группой 15 лет и старше, $p < 0,05$. Наиболее выраженные статистически достоверные различия отмечались в группе детей 1 – 3 года и лиц старше 30 лет, $p < 0,002$.

У пациентов с проявлениями воспалительного характера ЖКТ также регистрируются нарушения микробиоценоза толстой кишки. При сопоставлении полученных результатов содержания бактерий родов *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* и *E. coli* у пациентов с лямблиозной инвазией и при воспалительных заболеваниях ЖКТ, статистически значимые различия отмечаются по обнаружению бактерий родов *Lactobacillus* и *Enterococcus*. Дисбиоз толстой кишки при воспалительных заболеваниях ЖКТ характеризуется выраженным дефицитом *Lactobacillus spp.* и *Enterococcus spp.* по сравнению с дисбиозом при лямблиозе, ($p < 0,001$ и $p < 0,02$ соответственно). Дефицит *E. coli* с нормальной ферментативной активностью более выражен при заболеваниях ЖКТ воспалительного характера, но различия статистически не значимы. На фоне снижения *E. coli* с нормальной ферментативной активностью у 33,3% пациентов с заболеваниями ЖКТ отмечается частое обнаружение *E. coli* (Lac-) и *E. coli* (Gem+), грибов рода *Candida* и *Clostridium spp.*

Сравнительная характеристика высеваемости бактерий семейства *Enterobacteriaceae* (некоторых его родов) у пациентов с лямблиозной инвазией и воспалительными заболеваниями ЖКТ представлена на рисунке 3.

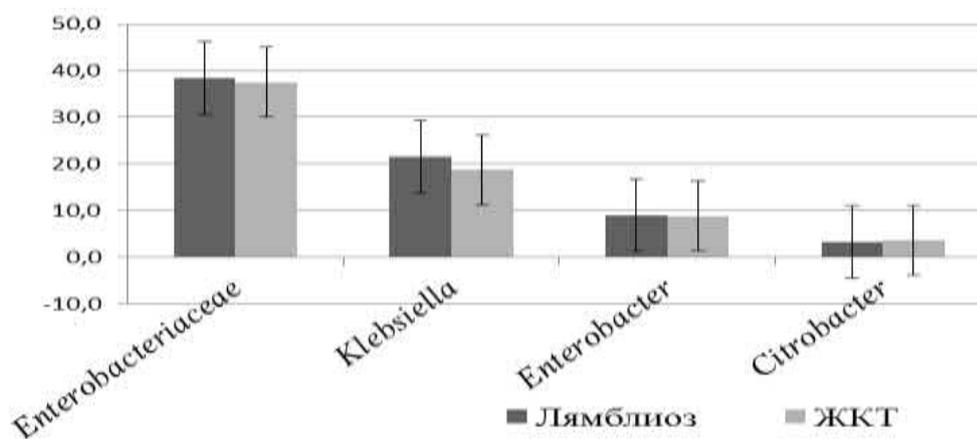


Рисунок 3 – Частота обнаружения бактерий семейства *Enterobacteriaceae* у пациентов с лямблиозом и воспалительными заболеваниями ЖКТ, %.

Сравнительный анализ высеваемости свидетельствует о более интенсивном выделении бактерий рода *Klebsiella* в содержимом толстой кишки у пациентов с лямблиозом, хотя различия статистически не значимы.

Нарушение микробиоценоза толстой кишки у пациентов с токсоплазмозом, проявляющееся снижением количества симбионтной микробиоты, характеризуется выраженным дефицитом бактерий рода *Lactobacillus* (Рисунок 4).

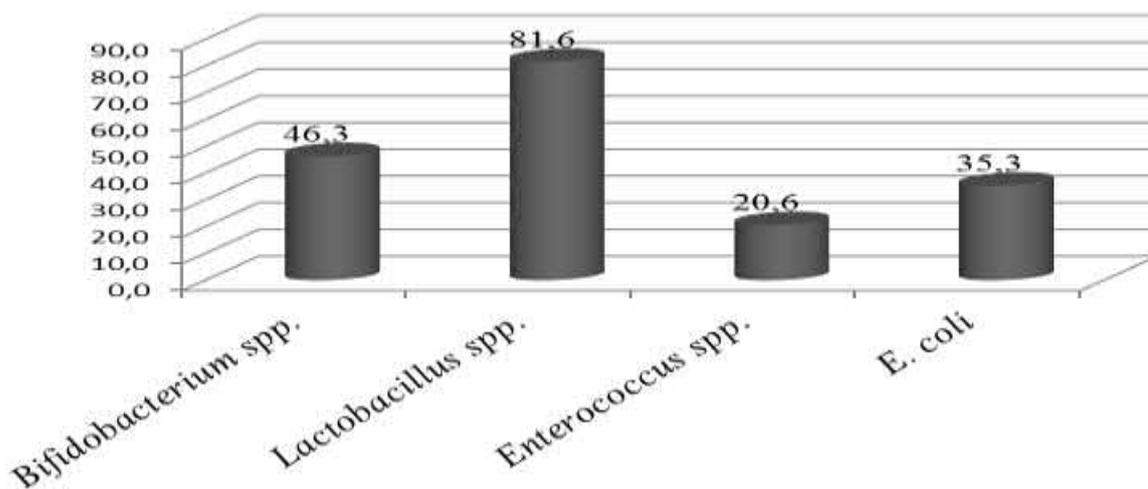


Рисунок 4 - Дефицит некоторых представителей микробиоты в содержимом толстой кишки у пациентов с токсоплазмозом, %

У пациентов с токсоплазмозом на фоне снижения содержания *E. coli* с нормальной ферментативной активностью отмечается повышенное выделение *E. coli* (Lac-) в $19,12 \pm 7,7\%$ случаев и *E. coli* (Gem+) - $7,35 \pm 8,2\%$. Кроме того, бактерии *S. aureus* идентифицировались в $22,06 \pm 7,6\%$, отмечались единичные случаи обнаружения грибов рода *Candida*. Высеваемость бактерий семейства *Enterobacteriaceae* составила $36,8 \pm 6,8\%$, чаще идентифицировались представители родов *Klebsiella*, *Citrobacter* и *Enterobacter*, их высеваемость составила $21,32 \pm 7,6\%$, $7,35 \pm 8,2\%$ и $4,41 \pm 8,3\%$ соответственно.

Токсокароз встречался реже по сравнению с другими исследуемыми инвазиями. В составе симбионтной микрофлоры толстой кишки у пациентов с токсокарозом выявлен выраженный дефицит *Lactobacillus spp.*, снижение содержания других представителей нормофлоры представлено на рисунке 5.

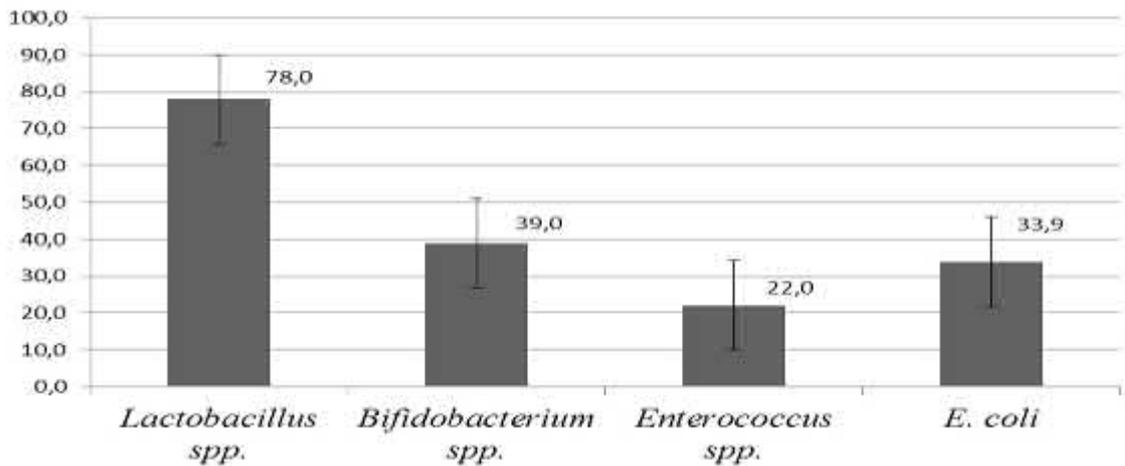


Рисунок 5 - Дефицит некоторых представителей нормофлоры в содержимом толстой кишки у пациентов с токсокарозом, %

На фоне уменьшения содержания *E. coli* с нормальной ферментативной активностью выделение *E. coli* (Lac-) составило $15,25 \pm 12,0\%$ и *E. coli* (Gem+) – $25,42 \pm 11,2\%$. Высеваемость представителей семейства *Enterobacteriaceae* составила $27,12 \pm 11,1\%$, преимущественно *Klebsiella spp.* и *Proteus spp.* *S. aureus* были изолированы у $20,34 \pm 11,6\%$ пациентов и отмечены единичные случаи обнаружения грибов рода *Candida*. Микстинвазии выявлялись в $40,68 \pm 6,4\%$ случаев, чаще отмечены миксты с токсоплазмозом, реже - с описторхозом и лямблиозом.

Микробиоценоз толстой кишки у пациентов при ИКБ характеризуется выраженным дефицитом *Lactobacillus spp.*, который определялся в $82,05 \pm 6,8\%$ случаев, дефицит *Bifidobacterium spp.* - в $58,97 \pm 10,3\%$. Содержание бактерий рода *Enterococcus* ниже нормы зарегистрировано у $17,95 \pm 14,5\%$ пациентов. Снижение количества *E. coli* с нормальной ферментативной активностью отмечено в $25,64 \pm 13,8\%$ случаев. Регистрировалось незначительное выделение *E. coli* (Lac-) и *E. coli* (Gem+) в равных количествах, показатель составил $7,69\%$. Представители семейства *Enterobacteriaceae* высеивались в $33,3 \pm 13,0\%$ случаев, чаще встречались *Klebsiella spp.* и *Proteus spp.*. Бактерии *S. aureus* идентифицировались у $17,95 \pm 14,5\%$ пациентов, грибы рода *Candida* высеивались редко. Почти у половины пациентов с диагнозом ИКБ диагностировались микстинвазии, чаще отмечалось сочетание с лямблиозом и токсоплазмозом, в меньшей степени с токсокарозом, не зарегистрированы случаи микст-инфекций с описторхозом.

Анализ симбионтной микрофлоры содержимого толстой кишки пациентов показал, что при различных паразитарных инвазиях регистрируется ее дефицит. Дисбиоз при изучаемых нами инвазиях, кроме описторхоза, характеризуется дефицитом бактерий рода *Lactobacillus*, снижение их количества колебалось от $67,6 \pm 4,7\%$ при описторхозе до $82,0 \pm 6,8\%$ при ИКБ. Дефицит бактерий рода *Bifidobacterium* регистрировался у пациентов с описторхозом. Отмечены статистически значимые различия в сравнении с лямблиозом ($p < 0,001$), токсоплазмозом ($p < 0,001$), токсокарозом ($p < 0,002$). Так, при сравнении с токсоплазмозом определены статистически значимые различия по *Lactobacillus spp.* ($p < 0,002$). Описторхозная инвазия характеризуется дефицитом *E. coli* с нормальной ферментативной активностью и бактериями рода *Enterococcus spp.* в

равной степени и тем самым отличается от других инвазий, при которых дефицит *E. coli* на порядок выше (Рисунок 6).

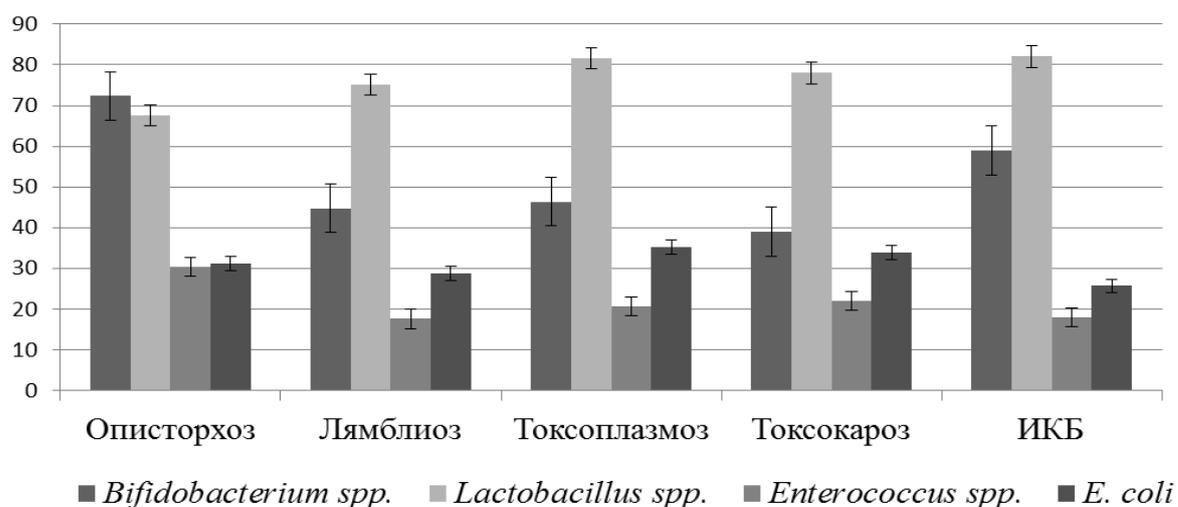


Рисунок 6 – Сравнительная характеристика дефицита нормофлоры толстой кишки у пациентов с некоторыми паразитарными инвазиями, %

Сравнение *E. coli* с нормальной ферментативной активностью, *E. coli* (Lac-) и *E. coli* (Gem+) показало, что при токсоплазмозе и токсокарозе чаще регистрировался дефицит *E. coli* (Рисунок 7). Вместе с тем, дефицит *E. coli* с нормальной ферментативной активностью находился в прямой корреляционной зависимости с *E. coli* (Lac-).

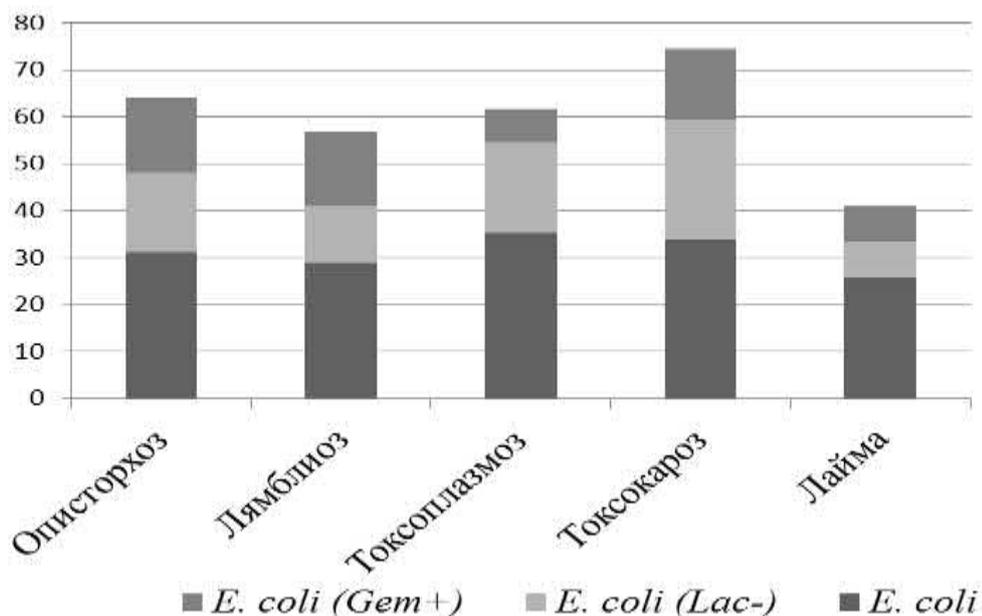


Рисунок 7 - Содержание *E. coli* при некоторых паразитозах, %

Высеваемость УПМ из содержимого толстой кишки у пациентов с паразитарными инвазиями свидетельствует о том, что лидирующее положение занимают бактерии рода *Klebsiella*, причем, при лямблиозе и тканевых паразитозах (токсоплазмозе и токсокарозе) значительно чаще (Рисунок 8).

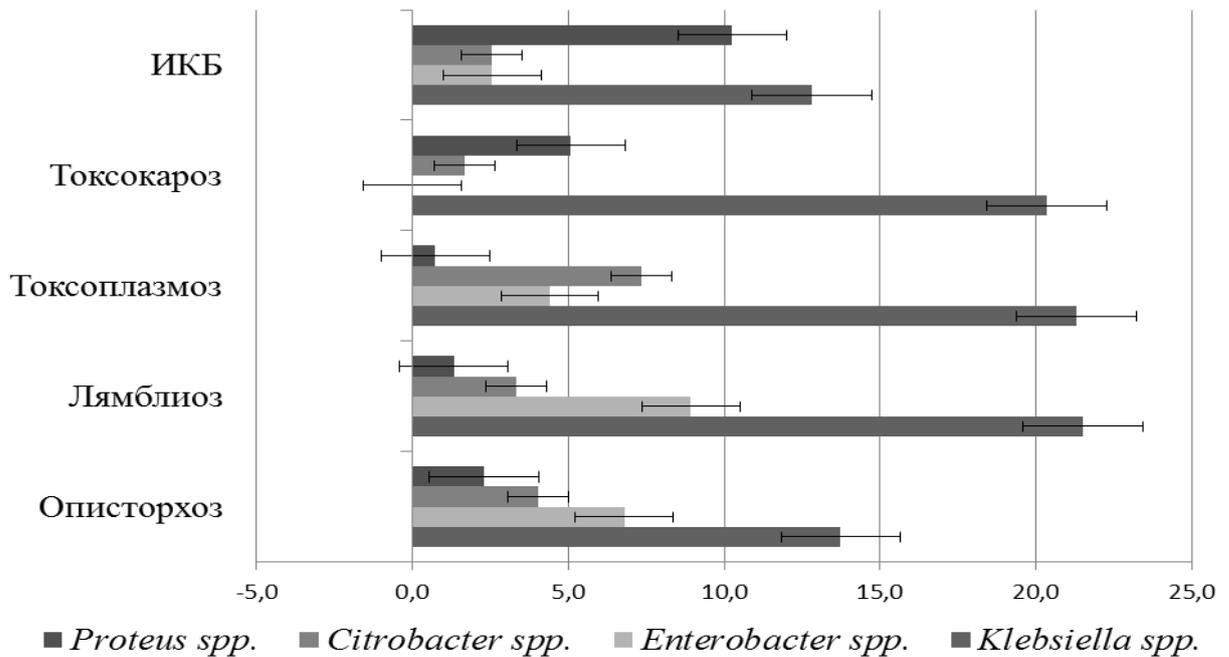


Рисунок 8 - Высеваемость бактерий некоторых родов семейства *Enterobacteriaceae* из толстой кишки пациентов с паразитарными инвазиями, %

При лямблиозе и токсоплазмозе высеваемость бактерий семейства *Enterobacteriaceae* и *S. aureus* несколько выше, чем при других инвазиях. Бактерии рода *Proteus* при ИКБ в сравнении с другими паразитами идентифицировались чаще. Статистически значимых различий в высеваемости указанных бактерий не выявлено. Вторые позиции по высеваемости принадлежат *S. aureus* и грибам рода *Candida*.

Нарушения микробиоценоза толстой кишки пациентов при инфекционно-инвазионном процессе преимущественно II и III степени регистрируются в 60,0% случаев. Они фиксируются за счет высокой высеваемости *E. coli* (Lac-) и *E. coli* (Gem+), бактерий родов *Klebsiella* и *Proteus*, *S. aureus*, а также ассоциаций грамотрицательных бактерий, *S. aureus* и грибов рода *Candida*.

Сопоставление функций нормальной микробиоты толстой кишки с ее количественным содержанием при паразитарных инвазиях выявило некоторые патогенетические механизмы. Высокую высеваемость УПМ можно объяснить тем, что функция колонизационной резистентности при выраженном дефиците нормофлоры (бактерий родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*) снижена или отсутствует. Кроме того, дефицит бактерий родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* в толстой кишке у пациентов с паразитарными инвазиями подтверждает факт интоксикации и сенсбилизации организма продуктами обмена и распада гельминтов, так как доказана роль *Lactobacillus spp.* в связывании и разрушении токсических веществ.

Как отмечалось выше, *E. coli* с нормальной ферментативной активностью, принимают участие в синтезе витаминов, обмене холестерина, билирубина, холина, желчных и жирных кислот. Таким образом, при дефиците их в микробном биоценозе толстой кишки в организме нарушаются обменные процессы, и страдает функция витаминообразования.

Молекулярно-генетические исследования штаммов *E. coli*, изолированных из толстой кишки пациентов с паразитозами и воспалительными заболеваниями ЖКТ, свидетельствуют о наличии у изученных штаммов *E. coli* кластеров генов О- и Н-серогрупп, относящихся к диареегенным - энтеротоксигенным (ЕТЕС) и энтероинвазивным (ЕИЕС). Также выявлены кластеры генов О-серогрупп внекишечных патогенных *E. coli* (ЕхРЕС), являющихся возбудителями инфекций мочевыводящих путей, бактериемий, менингитов. Треть исследуемых штаммов у пациентов по О-антигену отнесены к патотипу ЕТЕС. Среди ЕТЕС обнаружился серотип О6, в основном при описторхозной инвазии (3 штамма из 10), а также серотип О25, выделенный от пациентов с описторхозной инвазией и воспалительными заболеваниями ЖКТ. У пациентов с паразитозами обнаружены гены серогрупп О144 и О28ab, относящихся к ЕИЕС. Среди серотипов, отнесенных к ЕхРЕС, выявлены кластеры антигенов О1, О2 и О9 серогрупп, они встречались в группе пациентов с ЖКТ воспалительного характера. В группу прочих *E. coli* вошли серогруппы О12, О21, О73, О74, О81 и О169, которые чаще всего обнаруживались у пациентов с диагнозом лямблиоз. Кроме того, 4 штамма *E. coli*, выделенные от пациентов с лямблиозной инвазией и воспалительными заболеваниями ЖКТ, оказались не серотипируемые по О-антигену. Показано, что 8 из 10 исследованных штаммов *E. coli*, изолированных от пациентов с описторхозом, относились к группам: ЕТЕС - О6, О8, О25; ЕИЕС – О144; ЕхРЕС – О1, О2 (Таблица 1).

Таблица 1 - Сиквенс серотипы штаммов *E. coli*, выделенных из толстой кишки пациентов с хроническими паразитарными и воспалительными заболеваниями желудочно-кишечного тракта

Типы <i>E. coli</i>	Сиквенс серотипы штаммов		
	воспаления ЖКТ	Лямблиоз	Описторхоз
ЕТЕС	О6:Н16, О15:Н1, О25:Н1	О63:Н29	О6:Н1, О6:Н5, О6:Н31, О8:Н30, О25:Н4
ЕИЕС	-	О28ab:Н9	О144:Н45
ЕхРЕС	О1:Н7, О2:Н7, О2:Н6	О9:Н10	О1:Н7, О2:Н6,
Прочие	О141:Н32, О169:Н9	О12:Н4, О21:Н12, О74:Н23, О169:Н45, О81:Н27	О12:Н20, О73:Н31
О?	О?:Н7, О?:Н10,	О?:Н5, О?:Н6	-

Примечание: «О?» – несеротипируемые *E. coli*

Филогенетическое древо на основе определенных коровых SNP исследованных штаммов *E. coli* и полных геномов (хромосом) *E. coli*, находящихся в базе данных DDBJ/EMBL/GenBank представлено на рисунке 9. Штамм *E. coli*-1654-1 находится на отдельной далеко отходящей ветви.

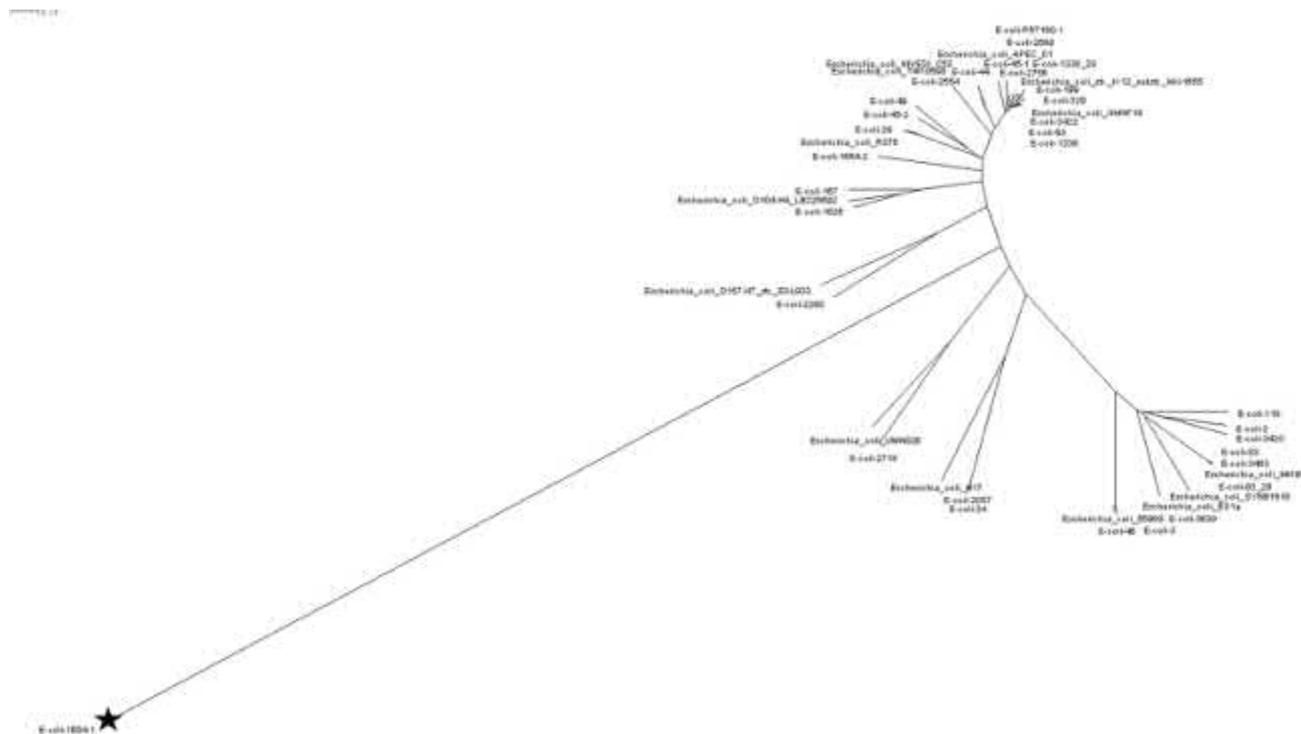


Рисунок 9 - Филогенетическое древо исследованных штаммов *E. coli* и полных геномов *E. coli*, находящихся в базе данных DDBJ/EMBL/GenBank.

Примечание: штамм *E. coli*-1654-1 обозначен звездочкой.

В филогенетическое исследование были добавлены геномы штаммов других видов рода *Escherichia* – *E. albertii*, *E. fergusonii*, *E. marmotae*. Это не позволило уточнить систематическое положение *E. coli*-1654-1, который оказался равноудаленным от других видов рода *Escherichia*. Штамм нельзя классифицировать как *Shigella spp.*, которые являются клональными видами и располагаются внутри группы штаммов *E. coli*.

Результаты полногеномного секвенирования штаммов *E. coli*, изолированных от пациентов с паразитозами и воспалительными заболеваниями ЖКТ, свидетельствуют о наличии у них 25 комплексов генов вирулентности: адгезинов - *pic*, *sfaS*, *iha*, *lpfA*; инвазинов - *mchF*, *iron*, *ireA*; токсинов - *astA*, *cnf1*, *vat*, *sat*, *senB*, *eilA*, *sigA*; бактериоцинов – *mchB*, *mchC*, *mcmA*, *cba*, *cma*, *selB*. Практически у всех штаммов (80 %) обнаружен ген increased serum survival (*iss*) – ген повышенной выживаемости в сыворотке крови, который причастен к птичьему колибактериозу, а также ген Glutamate decarboxylase (*gad*) – фермент, катализирующий процесс декарбоксилирования в микробной клетке. Ген enteroaggregative immunoglobulin repeat protein (*air*), который признается причиной диарейных заболеваний и ген Salmonella HilA homolog (*eilA*), являющийся главным регулятором «острова патогенности», определены у 3-х штаммов *E. coli*. На штаммы *E. coli*, изолированные от пациентов с описторхозом, пришлось 39,3% от количества идентифицированных комплексов генов вирулентности. Таким образом, описторхозная инвазия в большей степени влияет на колонизацию организма человека штаммами *E. coli*, носителями кластеров генов патогенности и вирулентности, что связано с выраженным влиянием метаболитов *O. felineus* и нарушением иммунитета.

Установлено, что на фоне паразитарной инвазии в микробиоценозе толстой кишки отмечаются нарушения, проявляющиеся дефицитом нормофлоры и появлением УПМ. Несомненно, что паразитарная инвазия и кишечный дисбиоз взаимосвязанные явления. Вследствие чего, исследование микробиоценоза толстой кишки необходимо при выявлении паразитарных инвазий. Своевременная коррекция дисбиоза толстой кишки способствует уменьшению воспалительного процесса кишечника за счет уменьшения количества УПМ и влияет на снижение интоксикации и повышение защитных сил организма, что содействует профилактике воспалительных заболеваний ЖКТ. Под действием симбионтов и метаболитов гельминтов при миграции их в различные системы организма человека происходят его морфофункциональные изменения. Детальное изучение дисбиоза кишечника с учетом роли микробиоты в патогенезе паразитарных заболеваний будет способствовать эффективной дегельминтизации пациентов и минимизации сроков восстановления организма после инвазии.

Межпопуляционные взаимодействия сочленов микропаразитоценоза

В эксперименте *in vitro* при совместном культивировании в искусственной питательной среде 199 бактерий *K. pneumoniae* и *S. aureus* с маридами *O. felineus* проведена оценка их взаимовлияния. Полная гибель марида в опытных группах произошла на восьмые сутки, при сокультивировании их с бактериями *K. pneumoniae* жизнеспособность сохранялась дольше (Таблица 2).

Таблица 2 - Жизнеспособность марида *O. felineus* при совместном культивировании с бактериями *K. pneumoniae* и *S. aureus*

Сутки наблюдения	Число жизнеспособных марида <i>O. felineus</i> при сокультивировании:					
	с бактериями <i>K. pneumoniae</i> (опыт 1)		с бактериями <i>S. aureus</i> (опыт 2)		без бактерий (контрольная группа 3)	
	абс.	% ± m	абс.	% ± m	абс.	% ± m
1	12	100,00	12	100,00	12	100,00
2	12	100,00	12	100,00	10	83,33±11,74
3	8	66,67±16,64	10	83,33±11,74	10	83,33±11,74
4	8	66,67±16,64	4	33,33±23,55	10	83,33±11,74
5	7	58,33±18,61	2	16,67±26,34	4	33,33±23,55
6	2	16,67±26,34	1	8,33±27,62	2	16,67±26,34
7	2	16,67±26,34	1	8,33±27,62	2	16,67±26,34
8	0	-	0	-	0	-
9	0	-	0	-	0	-
10	0	-	0	-	0	-

Жизнеспособность бактерий *K. pneumoniae* и *S. aureus* при культивировании их в среде 199 без марида (контрольные группы) сохранялась до конца наблюдения. При сокультивировании бактерий *K. pneumoniae* и марида *O. felineus* (опытная группа 1) в течение первых четырех суток наблюдения жизнеспособность микроорганизмов и марида оставалась практически на

первоначальном уровне и составила в среднем $5,1 \times 10^7$ КОЕ/мл и 10 экз. соответственно. На 5 – 6 сутки наблюдения количество бактерий *K. pneumoniae* в опыте снизилось до $2,9 \times 10^7$ КОЕ/мл, в то время как жизнеспособные марииты *O. felineus* на 5-е сут еще сохранялись, а на 6-е и 7-е сут наблюдения остались единичные жизнеспособные марииты. При этом количество бактерий *K. pneumoniae* на 7 – 8 сутки увеличилось до $5,2 \times 10^7$ КОЕ/мл, но к 9 – 10 суткам снижалось до $1,5 \times 10^7$ КОЕ/мл. Жизнеспособность *K. pneumoniae* в питательной среде без мариит достоверно выше, чем с мариитами (контрольная группа 1). По истечении 4-х суток наблюдения, также как и в опытной группе 1, отмечается снижение количества жизнеспособных бактерий *K. pneumoniae*, которое длилось до 7-х суток.

Высеваемость бактерий *S. aureus* при их совместном культивировании с мариитами *O. felineus* (вторая опытная групп) показала, что резкое падение количества жизнеспособных бактерий отмечалось на 2-е сутки наблюдения – с $7,5 \times 10^7$ до $0,6 \times 10^7$ КОЕ/мл. В контрольной группе 4 высеваемость бактерий *S. aureus* имела тенденцию к снижению на 5 – 6 сутки и до конца наблюдения оставалась на уровне $1,8 \times 10^7$ КОЕ/мл.

Жизнеспособность мариит резко снижалась после 5-х суток наблюдения и на 8 – 10-е сутки жизнеспособных мариит не оставалось во всех трех группах, характеризующих жизнеспособность мариит. Статистически значимых различий жизнеспособности мариит *O. felineus* в опытных и контрольной группах не зарегистрировано.

В ходе эксперимента исследовалось влияние мариит гельминта на изменение основных биохимических показателей, ферментов патогенности, а также чувствительности к антибиотикам и специфическим бактериофагам бактерий *K. pneumoniae* и *S. aureus*. Установлено отсутствие изменений биохимических свойств, активности ферментов патогенности, чувствительности к антибиотикам и бактериофагам под воздействием метаболитов мариит.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что метаболиты мариит *O. felineus* оказывают некоторое ингибирующее влияние на рост бактерий *K. pneumoniae* и *S. aureus*, причем последних в большей степени. При совместном культивировании *in vitro* *K. pneumoniae* и *S. aureus* не оказывали угнетающего влияния на марииты *O. felineus*. Вероятно, на первоначальном этапе это может быть связано с конкуренцией за питание и воздействием продуктов обмена мариит на функционирование микроорганизмов.

Микробиоценоз моллюсков семейства *Bithyniidae* как основа формирования симбиотических отношений в системе «паразит-хозяин» при описторхозе

Исследования микропаразитоценоза переднежаберных моллюсков битиниид - первых промежуточных хозяев *O. felineus* - и среды их обитания, свидетельствуют о широком спектре микробных популяций моллюсков. Доминирующей флорой их биоценоза являются бактерии рода *Aeromonas*, которые обнаруживались практически в каждой особи моллюсков от 2 до 6 видов. Лидирующее место в структуре их видового состава занимают *A. veronii*, *A. hydrophila*, *A. ichthiosmia* (Рисунок 10).

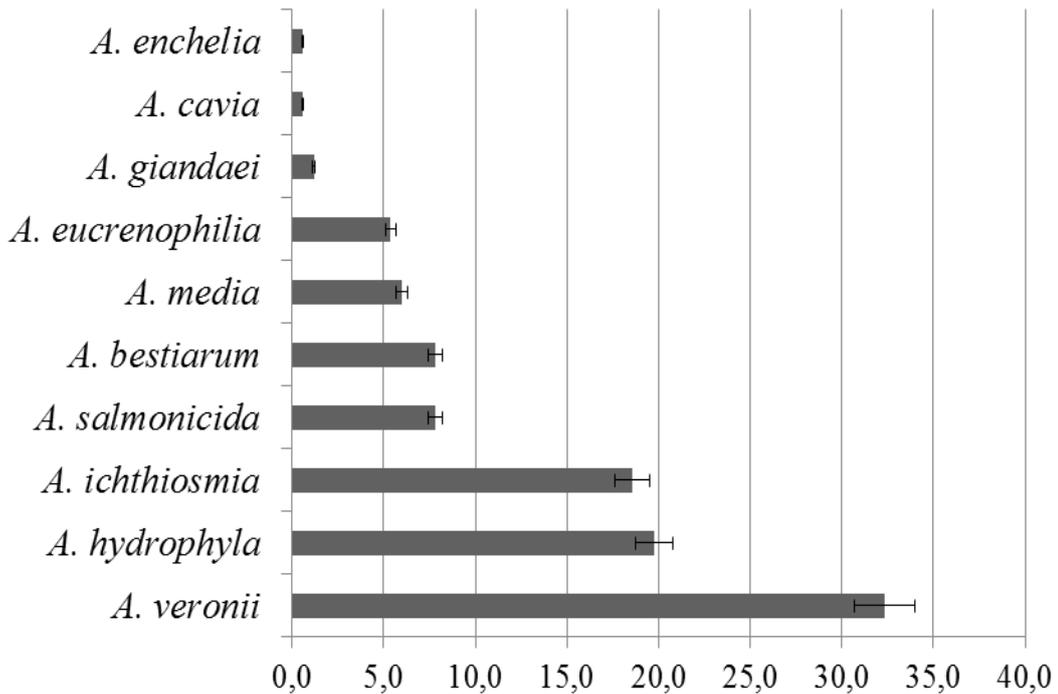


Рисунок 10 - Видовая структура бактерий рода *Aeromonas*, выделенных из битиниид, %

При сравнении микробиоценоза моллюсков и среды их обитания по определению *Aeromonas spp.* выявлено, что спектр видов в симбиозе моллюсков намного шире видового разнообразия этих бактерий, изолированных из среды их обитания. Отмечено 3 общих вида, характеризующих микробиоценоз моллюсков и среды обитания. Все исследованные штаммы обладали гемолитической активностью, отсутствием лизоцима и плазмокоагулазы, по лецитиназной активности отмечались некоторые статистически не значимые различия.

Проведенные исследования позволили установить, что выраженность антилизосимной активности (АЛА) и биопленкообразования (БПО) *Aeromonas spp.* варьировала в зависимости от источника выделения штаммов и не зависела от их видовой принадлежности. Штаммы, изолированные из битиниид, обладали наибольшей АЛА ($0,7 \pm 0,05$ мкг/мл*ОП), в то время как для водных штаммов этот показатель составил $0,5 \pm 0,04$ мкг/мл*ОП. Показатели БПО культур, выделенных из воды, имели более высокие значения - $0,4 \pm 0,02$ OD450, по сравнению с подобными показателями у штаммов, изолированных из моллюсков - $0,3 \pm 0,01$ OD450.

Штаммы бактерий, изолированные из битиниид и идентифицированные как НГОБ, отличались большим разнообразием. По частоте обнаружения лидирующее положение занимали бактерии родов *Pseudomonas* и *Comamonas*. Самой многочисленной и разнообразной группой бактерий, выделенных из битиниид, оказались бактерии рода *Pseudomonas* (11 видов). Причем в $20,62 \pm 9,05\%$ случаев идентифицировались бактерии *P. putida*, затем следовали *P. mendocina* и *P. mosselii* по $14,43 \pm 9,4\%$. Анализ НГОБ в составе микробиоценоза моллюсков и среды их обитания, свидетельствует о том, что из 19 видов, обнаруженных как в моллюсках, так и в среде их обитания - водоеме, определены

2 общих вида: *P. putida* и *Shewanella putrefaciens*; и 1 общий вид бактерий *Acinetobacter junii* в пробах придонного грунта (Рисунок 11).

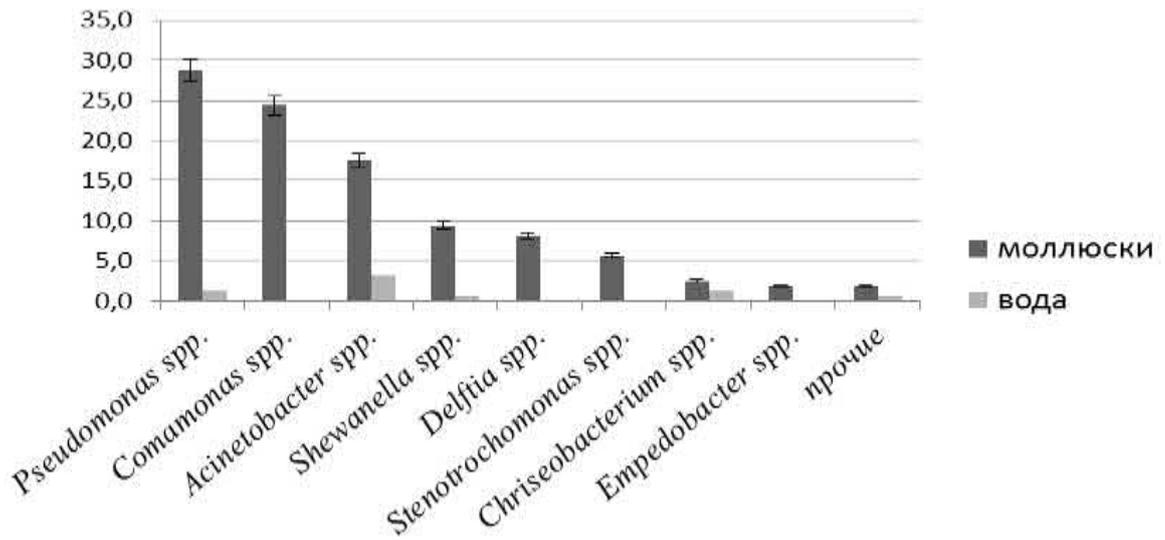


Рисунок 11 - Структура НГОБ, сочленов микробиоценоза моллюсков семейства *Bithyniidae* и среды их обитания, %

Анализ показателей АЛА показал, что у трети штаммов, относящихся к родам *Acinetobacter*, *Delftia*, *Comamonas*, *Chryseobacterium*, *Empedobacter* определялись его высокие значения. Среди бактерий родов *Shewanella*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas*, встречались единичные штаммы с высокими показателями АЛА (Таблица 3).

Таблица 3 - Персистентные свойства НГОБ, представителей микробиоценоза моллюсков битинийид (АЛА - мкг/мл*ОП, БПО - OD450)

НГОБ	Абс. число штаммов	Средние показатели АЛА	Штаммы с АЛА >1		БПО
			Показатель	Количество штаммов (%)	
<i>Pseudomonas spp.</i>	44	0,36±0,02	1,49±0,02	8 (18,18)	0,49±0,04
<i>Comamonas spp.</i>	39	0,51±0,02	1,55±0,02	11 (28,2)	0,43±0,03
<i>Acinetobacter spp.</i>	23	0,64±0,02	1,52±0,02	8 (34,78)	0,58±0,03
<i>Shewanella spp.</i>	14	0,26±0,02	1,74±0,03	1 (7,14)	0,45±0,03
<i>Delftia spp.</i>	13	0,78±0,01	1,7±0,01	4 (30,76)	0,49±0,03
<i>Stenotrophomonas spp.</i>	9	0,21±0,01	1,9±0,01	1 (11,11)	0,48±0,03
<i>Chryseobacterium spp.</i>	2	0,87±0,01	1,74±0,01	1 (50,0)	0,5±0,04
<i>Empedobacter spp.</i>	3	0,77±0,02	2,1±0,04	1 (33,33)	0,63±0,03
Прочие	2	0,49±0,01	0	0	0,43±0,05
Всего	149	0,54±0,02	1,54±0,02	35 (36,4)	0,5±0,04

Таким образом, в структуре микробиоценоза моллюсков битинийид – первого промежуточного хозяина *O. felineus* лидирующее положение среди НГОБ занимали бактерии родов *Pseudomonas*, *Comamonas* и *Acinetobacter*; в структуре микробиоценоза их среды обитания – *Acinetobacter*. Штаммы с выраженной АЛА преимущественно встречались среди *Acinetobacter spp.*, *Delftia spp.* и *Comamonas spp.* Показатель АЛА водных штаммов был на порядок выше штаммов,

выделенных из моллюсков, 2,13 и 0,9 соответственно. Разницы по свойству биопленкообразования не выявлено.

Бактерии семейства *Bacillaceae* в составе микробиоценоза битиниид характеризовались разнообразием и представлены 6 родами: *Bacillus* (78,9±3,81%), *Lysinibacillus* (6,48±2,37%), *Exiguobacterium* (3,53%), *Solibacillus* (5,7%), *Paenibacillus* (3,53%) и *Brevibacillus* (1,8±1,3%). Наиболее многочисленный и разнообразный по видовому составу род *Bacillus*: *B. pumilus* (20 штаммов), *B. licheniformis* (19 шт.), *B. megaterium* (9 шт.), *B. cereus* (6 шт.). Из воды идентифицировано 5 видов, относящихся к этому семейству. К роду *Bacillus* причислены виды *B. pumilus*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis*, *B. arsenicus*, к роду *Exiguobacterium* - один вид *E. aurantiacum*. В исследуемых пробах грунта водоема в местах сбора моллюсков также идентифицировались *B. pumilus* и *B. megaterium*. Кроме того, были идентифицированы бациллы *Exiguobacterium aurantiacum*, которые присутствовали как в структуре микробиоценоза моллюсков, так и водной среде обитания моллюсков.

В структуре микробиоценоза моллюсков битиниид бактерии семейства *Enterobacteriaceae* представлены 13 родами, и 20 видами. По частоте обнаружения представителей этого семейства более 50% всех выделенных штаммов составили бактерии родов *Enterobacter*, *Citrobacter* по 25,81±4,5% соответственно. Бактерии рода *Klebsiella* высевались в 19,35±4,1% случаев, *Plesiomonas shigelloides* - 15,05±3,7% (Рисунок 12).

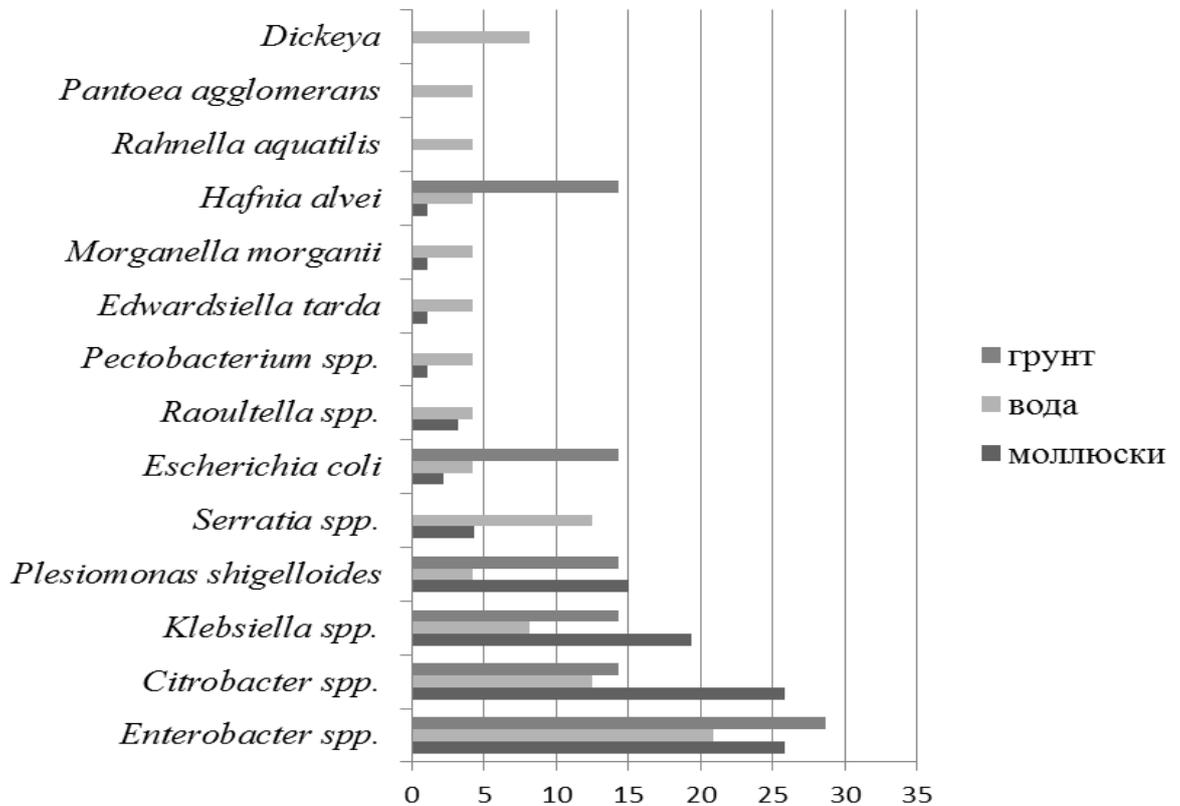


Рисунок 12 - Структура бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, составляющих микробиоценоз моллюсков и мест их обитания, %

Микробный пейзаж водоема отличался большим видовым разнообразием и представлен 24 видами, относящимися к 14 родам семейства *Enterobacteriaceae*:

Enterobacter, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Plesiomonas*, *Serratia*, *Escherichia*, *Raoultella*, *Pectobacterium*, *Erwinia*, *Morganella*, *Hafnia*, *Rahnella*, *Pantoea*, *Dickeya*. Спектр видов бактерий рода *Enterobacter* представлен *E. asburiae*, *E. cloacae*, *E. kobei*, *E. ludwigii*, *E. pyrinus*. В воде водоема обнаруживались виды, которые не были идентифицированы из моллюсков: *E. pyrinus*, *C. koseri*, *S. liquefaciens*, *P. carotovorum*, *Erwinia persicina*, *Rahnella aquatilis*, *Pantoea agglomerans*, *Dickeya zeeae*, *Dickeya chrysanthemi*. Таким образом, сравнительная характеристика микробиоценоза моллюсков с микробным пейзажем мест их обитания свидетельствовала о том, что водная среда имеет более разнообразный спектр представителей семейства *Enterobacteriaceae*, в то время как из придонного грунта водоема изолировано только 6 штаммов бактерий.

Среднее значение показателя АЛА штаммов семейства *Enterobacteriaceae* составило $0,51 \pm 0,001$ мкг/мл*ОП, при том, что штаммы, выделенные из моллюсков и воды водоема, имели одинаковые показатели - $0,45 \pm 0,002$ мкг/мл*ОП. Значение АЛА энтеробактерий, выделенных из грунта, достоверно выше ($p < 0.01$), в среднем составило $1,79 \pm 0,001$ мкг/мл*ОП. Среднее значение БПО для энтеробактерий - $0,27 \pm 0,02$ OD450, более высоким показателем отличались штаммы, изолированные из воды водоема - $0,29 \pm 0,02$ OD450. Средние значения БПО штаммов, выделенных из моллюсков и грунта, составили $0,26 \pm 0,02$ и $0,13 \pm 0,02$ OD450 соответственно.

Значительными показателями АЛА характеризовались штаммы родов *Raoultella* ($2,00 \pm 0,001$), *Plesiomonas* ($1,40 \pm 0,001$), *Serratia* ($0,95 \pm 0,001$). По показателю БПО наибольшие его значения регистрировались у бактерий родов *Klebsiella* ($0,62 \pm 0,03$), *Morganella* ($0,40 \pm 0,04$) и *Plesiomonas* ($0,37 \pm 0,01$). Среди водных энтеробактерий, высокие показатели АЛА отмечались у штаммов родов *Serratia* ($1,18 \pm 0,001$) и *Morganella* ($0,92 \pm 0,001$); по значениям БПО – бактерии рода *Kluyvera* - $0,78 \pm 0,01$ OD450. Штаммы родов *Escherichia* и *Enterobacter*, изолированные из грунта, имели высокие показатели АЛА и слабо выраженные свойства биопленкообразования (Рисунок 13).

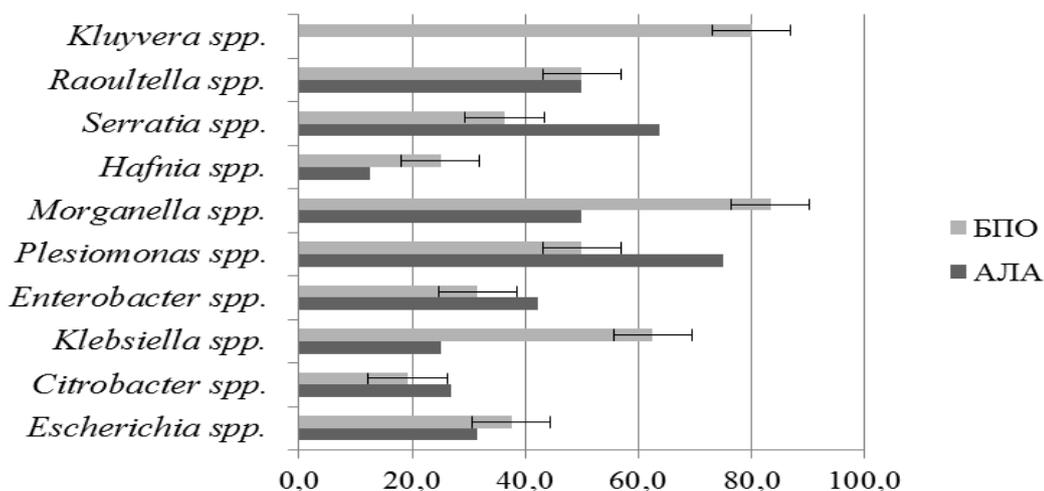


Рисунок 13 - Частота обнаружения штаммов бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, обладающих АЛА и БПО, %

В микробиоценозе водоема и грунта преобладали бактерии семейства *Enterobacteriaceae*. Результаты исследования микробных сообществ моллюсков и среды их обитания, указывают на широкий спектр видового состава популяций микробиоты моллюска в сравнении с микробиоценозом грунта и воды. Результаты исследований показали, что представители семейства *Enterobacteriaceae* в структуре микробиоценоза моллюсков составили $13,87 \pm 3,03\%$; водоемов и грунта - $63,2 \pm 5,1\%$ и $9,2 \pm 3,0\%$ случаев соответственно. Бактерии семейства *Bacillaceae* в структуре микробиоценоза моллюсков встречались в $22,9 \pm 2,96\%$ случаев, в то время как в микробном пейзаже водоема были выделены единичные штаммы.

Таким образом, показано наличие автохтонной и аллохтонной микробиоты моллюсков, которая, с учетом выявленных свойств персистенции, безусловно, оказывает влияние на его защитные механизмы, характеризующиеся выработкой иммунных комплексов.

Оценка сезонной динамики бактерий рода *Aeromonas* показала, что максимальное их количество ($42,5 \pm 3,2\%$) обнаруживалось в составе микробиоты моллюсков в конце мая - начале июня. В июле и августе регистрировалось снижение количества этих микроорганизмов до $33,3 \pm 3,8\%$ и $14,41 \pm 2,4\%$ соответственно. Таким образом, наблюдалась тенденция снижения количества *Aeromonas spp.* в микробиоценозе моллюсков в течение летнего сезона. Статистически значимые результаты получены при сравнении указанных показателей в июне и августе ($p < 0,01$).

Группа НГОБ, в отличие от бактерий рода *Aeromonas*, в течение летних месяцев постепенно увеличивалась в структуре микробиоты моллюсков. Анализ месячной динамики выделения бактерий родов *Acinetobacter*, *Comamonas*, *Shewanella*, *Pseudomonas* и других бактерий, включенных в эту группу, не выявил статистически значимых различий. При объединении всех родов прослеживается статистически значимая динамика нарастания их количества к августу ($p < 0,01$). Так, в июне высеваемость НГОБ регистрировалась в $32,08 \pm 3,0\%$ случаев, в июле - $29,9 \pm 3,7\%$, в августе $59,01 \pm 3,3\%$. Отмеченная динамика регистрировалась преимущественно за счет бактерий родов *Pseudomonas* и *Comamonas*.

Бактерии семейства *Enterobacteriaceae* в июне и августе в структуре микробиоты моллюска составляют незначительную часть - $5,4 \pm 1,5\%$ и $8,56 \pm 1,9\%$ соответственно. Существенное увеличение отмечалось в июле до $34,00 \pm 3,9\%$, при этом, статистически значимые различия регистрировались при сравнении показателей июня и августа с показателями июля ($p < 0,01$) (Рисунок 14). Наличие энтеробактерий в водных объектах и в составе микробиоценоза моллюсков отражает уровень фекального загрязнения биоценоза окружающей среды. В самый теплый летний месяц - июль - антропогенное фекальное загрязнение (купание, рыбная ловля и др.) максимальное, что определяет возрастание доли бактерий семейства *Enterobacteriaceae* в структуре микробиоты моллюсков.

Таким образом, в начале весенне-летнего сезона в структуре микробиоты преобладают бактерии рода *Aeromonas* в целом и по видовому разнообразию, которые к концу лета «замещаются» НГОБ. Важно отметить, что *Aeromonas spp.* в начале летнего сезона, имея преимущество по разнообразию видов и количеству в

структуре микробиоты, отличаются невысокими показателями АЛА (0,7 мкг/мл ОП), в то же время бактерии группы НГОБ, накапливаясь к августу, обладают более выраженной АЛА (1,54 мкг/мл ОП). Таким образом, в период максимальной пораженности моллюсков личинками *O. felineus* его микробиота обладает минимальной АЛА.

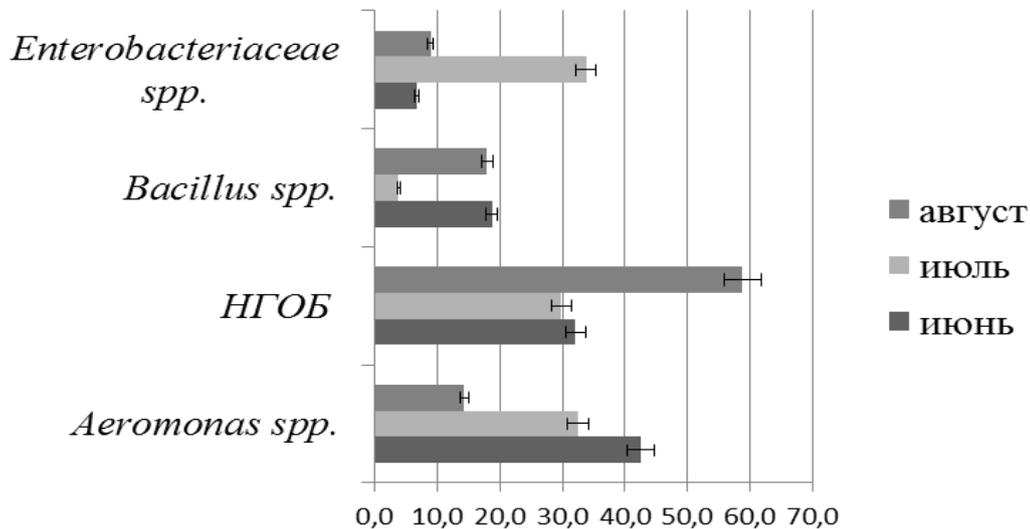


Рисунок 14 - Сезонная динамика основных представителей микробиоты моллюсков, %

Полученные результаты показали пик «активных» микроорганизмов в период максимальной пораженности моллюсков, что не противоречит результатам исследований сотрудников Тюменского научно-исследовательского института краевой инфекционной патологии. Это позволило нам обосновать гипотезу о влиянии микробиоценоза моллюска на приживаемость яиц в его организме, поскольку микробиота любого живого организма участвует во всех биохимических процессах и влияет на иммунный статус. Полагаем, что микрофлора, формируя колонизационную резистентность, препятствует физиологической адаптации яйца в организме моллюска, и как следствие – запуску цикла развития *O. felineus*. Сезонная изменчивость микробиоты моллюсков увеличивает экологическую емкость микробных сообществ и разнообразие ниш во времени. Изучение сезонной изменчивости микропаразитоценоза, помимо чисто теоретического интереса, имеет важное практическое значение, связанное с закономерностями в структуре и динамике микробиоты моллюсков.

Распространенность бактерий рода *Aeromonas*

Повышенные концентрации *Aeromonas spp.* в водных экосистемах в весенне-летний период создают возможность воздействия на организм рыбы, животных и человека. Это подтверждается обнаружением *Aeromonas spp.* в $59,1 \pm 10,5\%$ проб воды открытых водоемов.

Результаты микробиологического исследования лечебной грязи показали, что в $32,2 \pm 7,5\%$ проб были обнаружены бактерии рода *Aeromonas spp.* Однако бактерии этого рода не учитываются как санитарно-показательные

микроорганизмы (МУ №143-9/316-17 «Методические указания по санитарно-микробиологическому анализу лечебных грязей»).

В результате исследования рыб семейства карповых установлена их зараженность жизнеспособными личинками *O. felineus*. Зараженность язя (*Leuciscus idus*) была наибольшей и составила $82,4 \pm 9,2\%$ со средней интенсивностью инвазии 143 личинки в 1 экземпляре рыбы. Количество метацеркарий в 1 г мышц в среднем $14,7 \pm 3,2$ личинки и варьировало от 2 до 42. Экстенсивность инвазии плотвы (*Rutilus rutilus lacustris*) установлена в $30,8 \pm 7,4\%$ со средним количеством личинок $4,5 \pm 2,6$ в 1 г мышц. Из 10 исследованных экземпляров уклей (*Alburnus alburnus*), поражена метацеркариями *O. felineus* была лишь одна особь.

Микробиоценоз кишечного содержимого рыб представлен ассоциациями бактерий семейства *Enterobacteriaceae* (53,3%) и *Aeromonadaceae* (46,7%). В структуре бактерий семейства *Enterobacteriaceae* идентифицировались штаммы родов *Klebsiella* (43,75%), *Citrobacter* (25,0%), *Serratia* (18,75%), *Raoultella* и *Enterobacter* (по 6,25% соответственно). Семейство *Aeromonadaceae* представлено видами *A. salmonicida* (35,7%), *A. hydrophila* и *A. bestiarum* (по 21,4% соответственно); *A. ichthiosmia*, *A. eucrenophila* и *A. veronii* (по 7,1% соответственно).

Сравнительный анализ контаминации бактериями замороженной и свежесвыловленной рыбы свидетельствовал о более высокой обсемененности последней. Так, на 1 экземпляр свежей рыбы приходится 2,2 штамма бактерий, в то время как на 1 экземпляр замороженной рыбы приходится 1,6 штаммов. В том числе, контаминация бактериями *Aeromonas spp.* на 1 экземпляр замороженной рыбы составила 0,1 (6 штаммов на 53 экземпляра рыб), а свежесвыловленной рыбы – 0,6 штаммов бактерий (20 штаммов на 31 экземпляр).

Таким образом, полученные результаты исследования свидетельствуют о высокой контаминации микроорганизмами рыб, не подвергающейся низкотемпературной обработке до употребления в пищу. Микроорганизмы, изолированные из рыб, инвазированных личинками возбудителя описторхоза, относятся к условно-патогенным бактериям и играют роль в этиологии воспалительных заболеваний кожи рыб, что влияет на качество пищевой рыбной продукции. Поэтому, при обработке рыбы (чистка, потрошение, разделывание) необходимо соблюдать гигиенические правила, предотвращающие контаминацию рук, разделочных досок и рабочих поверхностей. Соблюдение условий хранения и режима обработки рыбы позволят минимизировать риски заражения биогельминтозами, передающимися через рыбу, и бактериальными инфекциями желудочно-кишечного тракта у населения.

Анализ случаев выделения бактерии рода *Aeromonas* из клинического материала пациентов показал, что чаще всего они изолировались из мочи (55 штаммов), реже обнаруживались в мазках со слизистой зева и при исследовании фекалий на дисбиоз. Единичные штаммы изолированы со слизистой носа, из бронхов, мокроты, цервикального канала, влагалища, грудного молока, кисты семенного канатика, уха, раневого отделяемого и при патологоанатомическом исследовании трахеи (Рисунок 15).

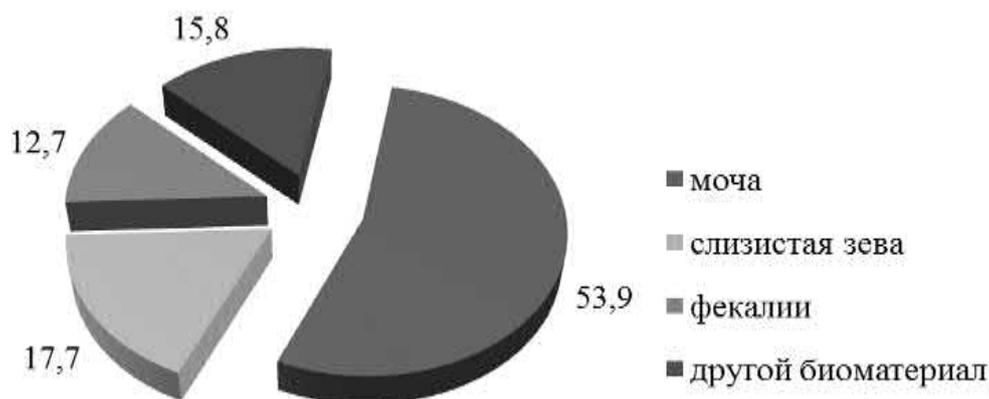


Рисунок 15 – Частота обнаружения бактерий *Aeromonas spp.* в клиническом материале, %

Видовая характеристика бактерий рода *Aeromonas*, изолированных из различных проб биоматериала, характеризовалась разнообразием. Выделено и идентифицировано 9 видов, среди которых наиболее часто идентифицировались *A. caviae* и *A. hydrophila* (Рисунок 16).

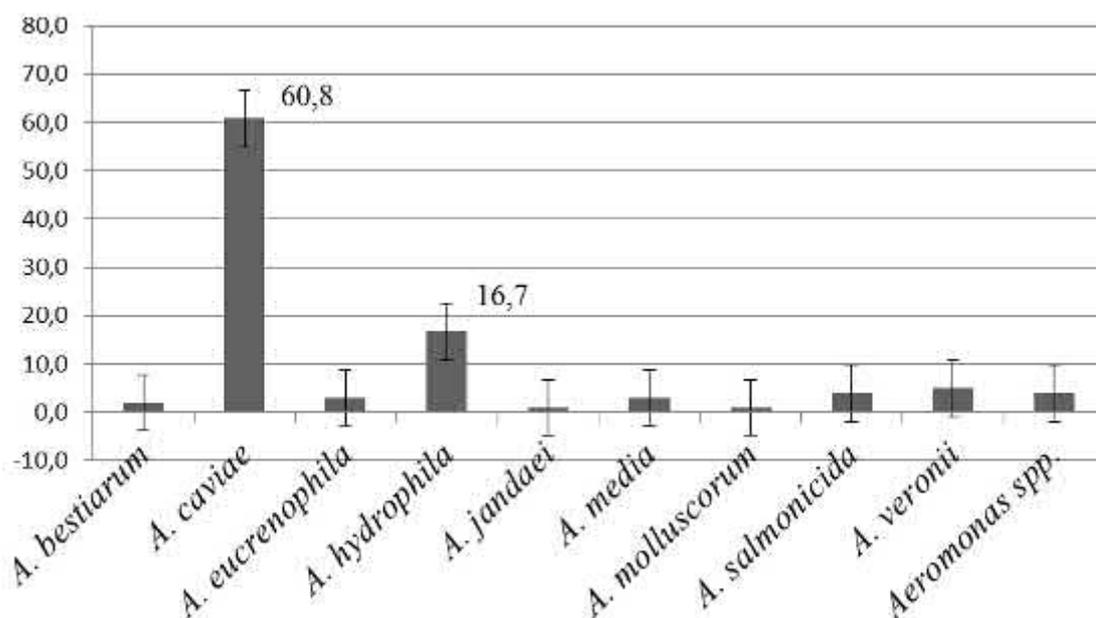


Рисунок 16 - Структура бактерий *Aeromonas spp.*, выделенных из клинического материала, %

Анализ сезонности высеваемости *Aeromonas spp.* из клинического материала выявил два «пика» подъема - апрель и сентябрь. Причем сезонные подъемы характерны как для южных районов Тюменской области, так и ХМАО-Югры, показатель корреляционной зависимости месячной динамики обнаружения аэромонад у пациентов этих регионов составил – 0,81.

Проведенные исследования показали, что в 48,04% проб биоматериала бактерии рода *Aeromonas* изолировались в монокультуре, в остальных пробах в ассоциациях: 34,3% проб – 2 культуры микроорганизмов, 12,74% - 3 культуры и

4,9% - 4 вида бактерий. В одной пробе биоматериала из наружного слухового прохода обнаружено 5 видов микроорганизмов. В ассоциациях с *Aeromonas spp.* высевались бактерии родов *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *K. pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* и другие УПМ. Важно отметить, что выделенные из биоматериала бактерии рода *Aeromonas* в 90% случаев обладали гемолитической активностью независимо от вида, локуса выделения, ассоциации или монокультуры.

Исследование чувствительности к антибактериальным препаратам *Aeromonas spp.* выявило резистентность к тикарциллин/клавуланату (группа пенициллинов + ингибитор β -лактомаз) и колистин (группа полимиксинов) по минимальной ингибирующей концентрации (МИК) (Рисунок 17).

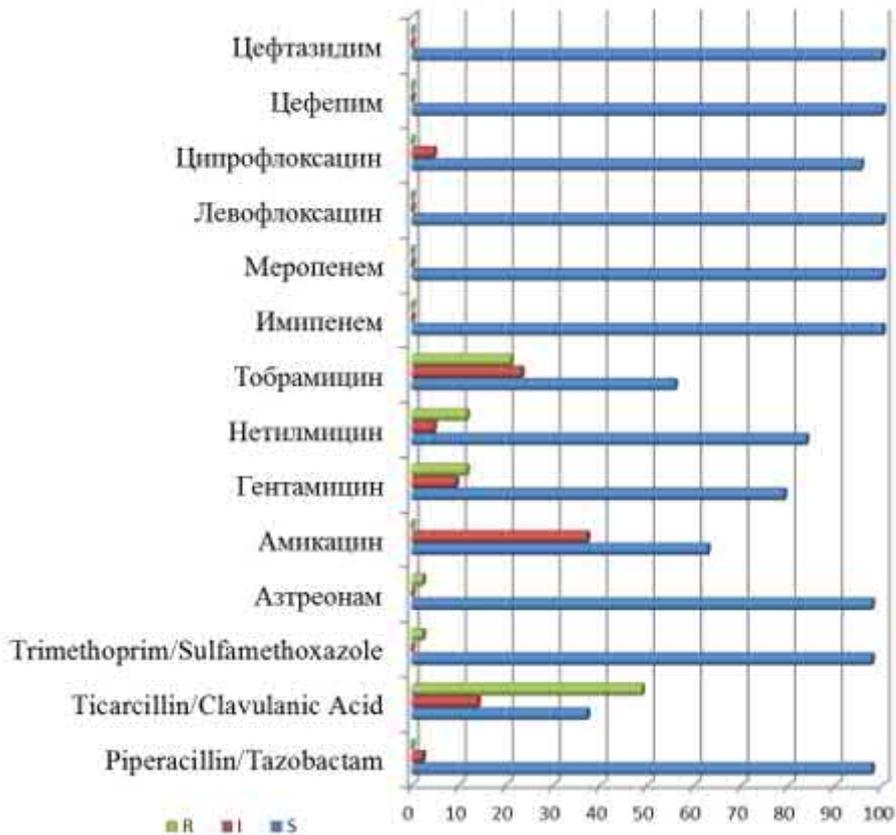


Рисунок 17 - Резистентность бактерий рода *Aeromonas* к антимикробным препаратам по минимальной подавляющей концентрации, %

Проведен сравнительный анализ дендрограмм клинических штаммов *A. hydrophila*, *A. salmonicida* и *A. veronii* со штаммами, выделенными из воды и рыб. Дендрограмма штаммов *A. hydrophila*, выделенных из рыб - 4f, 1a, 3b, 1b; из воды – штамм 159; из клинического материала – штамм 1690, представлена на рисунке 18(A). Анализ кластеров белков свидетельствует о том, что сравниваемые водный штамм и штаммы, изолированные из рыб, имеют близкое филогенетическое родство, а кластеры белков клинического штамма, подтверждают только его видоспецифичность.

Кластеры белков анализируемых штаммов *A. salmonicida* (8a, 2a, 4e, 7b–изолированные из рыб; 170 – водный штамм; штамм 9650 – из клинического

материала) распределились на две группы (Рисунок 18(B)). Протеомный профиль клинического штамма объединился с кластерами штаммов, изолированных из рыб; во вторую группу кластеров вошли профили белков водного штамма и штаммов, изолированных из рыб.

Дендрограмма белковых спектров бактерий *A. veronii*, отображает протеинограммы штаммов, изолированных из рыб - 8b, 3a, 2c, 14a, клинического материала – штамм 1715 и поверхностного слоя воды открытых водоемов – штаммы 147, 146a (Рисунок 18(C)). Белковые спектры всех штаммов этого вида практически распределились в одной группе кластеров, что свидетельствует об их близком филогенетическом родстве, исключение составил штамм 14a.

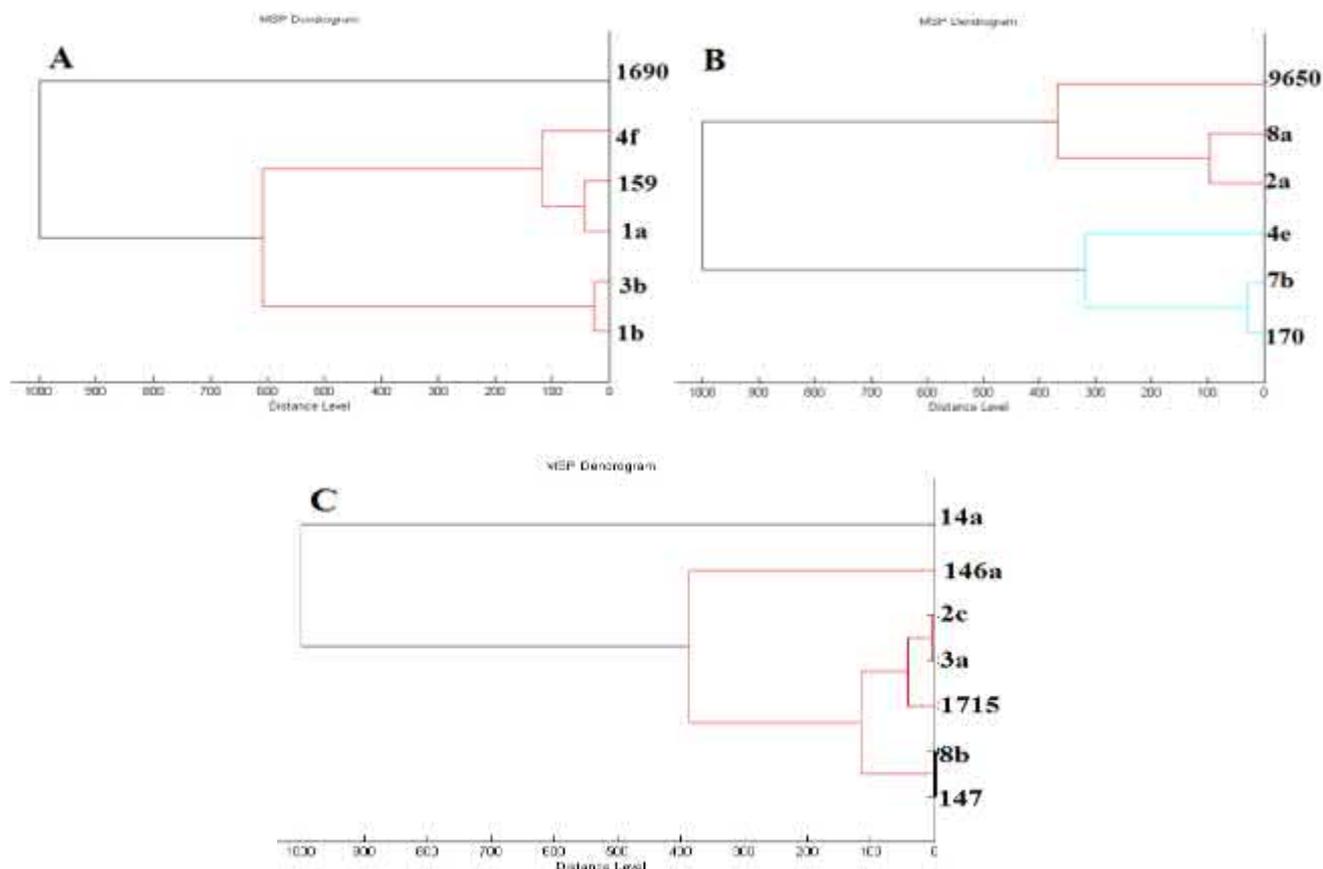


Рисунок 18 - Дендрограммы протеомных спектров штаммов *A. hydrophila* (A), *A. salmonicida* (B) и *A. veronii* (C)

Сравнительный анализ дендрограмм клинических штаммов *A. hydrophila*, *A. salmonicida* и *A. veronii* со штаммами, выделенными из воды и рыб, а также высокий коэффициент корреляции их белковых спектров (0,89), свидетельствует о том, что воду и рыбу можно рассматривать как факторы передачи при аэромонадной инфекции, а бактерии рода *Aeromonas* - в качестве критерия микробиологической оценки водных объектов и рыбной продукции.

Вместе с тем, в структуре клинических штаммов рода *Aeromonas*, изолированных из различных локусов, преимущественно идентифицировались *A. caviae*. В исследование взято 8 штаммов этого вида, выделенных от пациентов, проживающих в городах юга Тюменской, Свердловской областей, ХМАО-Югры. Максимальное подобие белковых спектров отмечено у штаммов, изолированных

из мочи. Важно подчеркнуть, что эти клинические штаммы изолированы от пациентов, проживающих на географически отдаленных территориях. Это подчеркивает их штаммоспецифичность и указывает на то, что бактерии рода *Aeromonas* имеют широкое распространение.

Таким образом, применение протеомного анализа для характеристики штаммов бактерий расширяет возможности оценки их циркуляции в окружающей среде и контаминации организмов человека и животных. Обнаружение бактерий рода *Aeromonas* в клиническом материале пациентов, их видовое разнообразие, выделение в монокультуре и ассоциациях, резистентность к антибиотикам свидетельствуют об этиологической значимости этих микроорганизмов в инфекционно-инвазионной патологии. Для совершенствования биологической безопасности водных объектов актуальным является изучение их микробиоценоза, в частности циркуляции бактерий рода *Aeromonas*, с целью получения информации о патогенных свойствах, антибиотикорезистентности, сезонных колебаниях. Для предотвращения распространения инфекций вызванных бактериями рода *Aeromonas*, необходимо проведение микробиологических исследований воды, объектов окружающей среды, рыбной продукции.

ВЫВОДЫ

1. Установлены нарушения кишечного микробиоценоза у пациентов с паразитарными инвазиями, связанные с дефицитом индигенной микробиоты: *Bifidobacterium spp.* менее 10^8 КОЕ/г при описторхозе (72,3%); *Lactobacillus spp.* менее 10^6 КОЕ/г - лямблиозе, токсоплазмозе, токсокарозе и иксодовом клещевом боррелиозе (74,7%). Снижение количественного содержания *Bifidobacterium spp.* обуславливает частоту обнаружения бактерий рода *Klebsiella* (33,4%) и *S. aureus* (20,4%).
2. Выявлено влияние описторхозной инвазии на колонизацию толстой кишки человека энтеропатогенными штаммами *E. coli* (ЕТЕС - О6, О8, О25; ЕІЕС – О144), носителями кластеров О-антигенов (80,0%) и генов, ассоциированных с вирулентностью (38,6%).
3. Метаболиты марит *O. felineus (in vitro)* оказывают ингибирующее влияние на персистенцию бактерий *K. pneumoniae* и *S. aureus*, которое подтверждается снижением их количества с $5,1 \times 10^7$ до $1,5 \times 10^7$ КОЕ/мл и с $7,5 \times 10^7$ до $0,6 \times 10^7$ КОЕ/мл соответственно.
4. Определена структура микробиоценоза первых промежуточных хозяев *O. felineus*, которая представлена бактериями рода *Aeromonas* (39,6%), неферментирующими грамотрицательными бактериями (35,0%), бактериями семейств *Enterobacteriaceae* (13,9%) и *Bacillaceae* (11,5%).
5. Сезонная динамика микробиоценоза моллюсков характеризуется преобладанием в начале лета *Aeromonas spp.* (42,5%) с низким показателем антилизотимной активности (0,7 мкг/мл ОП), к окончанию летнего сезона их количество снижается (14,4%), при этом повышается частота обнаружения неферментирующих грамотрицательных бактерий (59,01%) с высокой антилизотимной активностью (1,54 мкг/мл ОП).

6. В период максимальной пораженности моллюсков личинками *O. felineus* микробиота его обладает слабо выраженной антилизоцимной активностью. Пик микроорганизмов, обладающих выраженными свойствами персистенции, совпадает с максимальной пораженностью моллюсков.

7. Отмечена контаминация рыб семейства *Cyprinidae*, инвазированных личинками *O. felineus*, ассоциациями бактерий семейства *Enterobacteriaceae* (53,3%) и *Aeromonadaceae* (46,7%); превалирование штаммов родов *Klebsiella* (43,75%), *Citrobacter* (25,0%), *A. salmonicida* (35,7%), *A. hydrophila* (21,4%) и *A. bestiarum* (21,4%).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Комплекс диагностических тестов при обследовании на наличие паразитарной инвазии должен включать исследование микробиоценоза толстой кишки, результаты которого позволят провести коррекцию нарушений и профилактику воспалительных заболеваний желудочно-кишечного тракта, вызванной дегельминтизацией пациента.

Схемы лечения паразитарных инвазий должны содержать назначения пробиотиков на основе: *Bifidobacterium spp.* при описторхозе; бактерий рода *Lactobacillus* - лямблиозе, токсоплазмозе, токсокарозе и иксодовом клещевом боррелиозе.

Контаминация карповых видов рыб, являющихся вторым промежуточным хозяином *O. felineus*, бактериями семейств *Enterobacteriaceae* и *Aeromonadaceae*, может свидетельствовать о инвазированности рыб личинками паразита и влиять на микробиологические и паразитологические показатели при оценке качества рыбной продукции.

Представляется целесообразным для идентификации видового разнообразия бактерий рода *Aeromonas* использовать метод масс-спектрометрии при проведении бактериологического исследования мочи для улучшения диагностики урогенитальной инфекции.

С целью расшифровки вспышек бактериальных инфекций и определения источника заражения целесообразно проведение протеомного анализа подобия штаммов бактерий, изолированных из различных объектов окружающей среды и клинического материала.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Дальнейшее продолжение исследований считаем необходимым направить на изучение микропаразитоценозов, опирающееся на результаты метагеномного анализа микробиоты толстой кишки в эксперименте на лабораторных животных – золотистых хомячках, инвазированных возбудителем описторхоза, которое позволит нивелировать факторы, оказывающие влияние на микробиоценоз кишечника окончательного хозяина. Сравнительный анализ данных метагеномного исследования микробиоты лабораторных животных опытных и контрольных групп позволит выявить маркеры инвазии, на основе которых возможна разработка праймеров для создания диагностического набора, выявляющего возбудителя *O. felineus* методом полимеразной цепной реакции.

Созданная рабочая коллекция штаммов бактерий, изолированных от пациентов с паразитозами, требует дальнейшего расширения и углубленного биоинформационного анализа для создания национальной базы данных, в рамках формирования системы микробиологического мониторинга.

Необходимо дальнейшее изучение комплекса взаимоотношений микроорганизмов в кишечном биотопе и в объектах окружающей среды, которое с учетом вовлечения в процесс промежуточных и окончательных хозяев паразита, дополнит фундаментальные знания о закономерностях их взаимовлияния в микропаразитоценозе.

С целью минимизации рисков распространения бактериальных инфекций, факторами передачи которых являются объекты окружающей среды (вода, грунт, рыбная продукция), необходимо дальнейшее совершенствование микробиологического мониторинга, включающего контроль циркуляции бактерий рода *Aeromonas*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Катаева, Л. В.** Дисбиоз толстого кишечника при токсоплазмозе / **Л. В. Катаева, Т. Ф. Степанова, К. Б. Степанова, Л. А. Бычкова, Н. Ф. Нижегородцева** // Актуальные аспекты паразитарных заболеваний в современный период: Всероссийская конференция, 17-18 сентября 2008 г. - Тюмень, 2008. - С. 118-119.
2. **Катаева, Л. В.** Роль дисбиоза кишечника в патогенезе описторхоза / **Л. В. Катаева, Т. Ф. Степанова, К. Б. Степанова, Л. А. Бычкова, Н. Ф. Нижегородцева** // Актуальные аспекты паразитарных заболеваний в современный период: Всероссийская конференция, 17-18 сентября 2008 г. - Тюмень, 2008. - С. 120-122.
3. **Катаева, Л. В.** Возрастные особенности дисбиоза толстой кишки / **Л. В. Катаева, К. Б. Степанова, Т. Ф. Степанова, Н. Ф. Нижегородцева, В. В. Ташланова** // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. - 2010. - № 1. - С. 76-80.
4. **Катаева, Л. В.** Возрастные особенности дисбиоза толстого кишечника при лямблиозной инвазии / **Л. В. Катаева, К. Б. Степанова, Т. Ф. Степанова, В. В. Ташланова, Е. И. Швед, Н. Ф. Нижегородцева, Л. А. Бычкова** // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 2011. - № 1. – С. 7-10.
5. **Катаева, Л. В.** Перспективы изучения закономерностей функционирования микропаразитоценозов человека / **Л. В. Катаева, Т. Ф. Степанова, Н. Ф. Нижегородцева, В. В. Ташланова** // Итоги и перспективы обеспечения эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации: материалы X съезда всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов, 12-13 апреля 2012 г. - Москва, 2012. – Т. 2, №1-2. - С. 364-365.
6. **Катаева, Л. В.** Паразитоценотические отношения в микропопуляциях мариит описторхов и условно патогенных микроорганизмов (модель *in vitro*) / **Л. В. Катаева, Н. Ф. Нижегородцева, Т. Ф. Степанова** // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 2013. - № 3. – С. 15-18.
7. **Катаева, Л. В.** Видовой состав бактерий рода *Enterococcus*, выделенных из кишечника человека / **Л. В. Катаева, Т. Ф. Степанова, А. А. Вакарина, О.Н.**

Колотова, В. В. Ташланова // Прикладная микробиология. – 2013. - № 1. – С. 30-33.

8. Катаева, Л. В. Симбиотические взаимодействия в микропаразитоценозе / Л. В. Катаева, Т. Ф. Степанова, Н. Ф. Нижегородцева, В. В. Ташланова // Сборник материалов научно-практической конференции, посвященной 90-летию образования государственной санитарно-эпидемиологической службы Российской Федерации. - Тюмень: Печатный дом "Цессия". - 2012. - С. 222-224.

9. Катаева, Л. В. Сравнительная характеристика микробиоценоза кишечника больных описторхозом, проживающих в г. Тюмени и гиперэндемичных районах Тюменской области / Л. В. Катаева, Н. Ф. Нижегородцева, Т. Ф. Степанова // Биозащита и биобезопасность. – 2013. – Т. V, № 3 (16). – С. 28-32.

10. Катаева, Л. В. Микросимбиоценоз моллюсков рода *Codiella* как основа формирования симбиотических отношений в системе «паразит-хозяин» при описторхозе / Л. В. Катаева, Н. Ф. Карпухина, Т. Ф. Степанова, К. Б. Степанова // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 2014. - № 3. – С. 13-17.

11. Ташланова, В. В. Динамика распространенности лямблиоза на территории юга Тюменской области / В. В. Ташланова, Л. В. Катаева, Т. Ф. Степанова, К. Б. Степанова, Д. Р. Сабирова // Здоровье населения и среда обитания. – 2015. - № 3(264). – С. 48-50.

12. Катаева, Л. В. Литическая активность бактериофагов в отношении возбудителей острых кишечных инфекций / Л. В. Катаева, А. А. Вакарина, Т. Ф. Степанова, К. Б. Степанова, Л. А. Бычкова // Здоровье населения и среда обитания. – 2015. - №3 (264). С. 39-42.

13. Степанова, Т. Ф. Видовой состав и биологические свойства бактерий рода *Aeromonas*, выделенных из моллюсков – битинийд и мест их обитания. Сообщение 1 / Т. Ф. Степанова, О. В. Бухарин, Л. В. Катаева, Н. Б. Перунова, Н. Ф. Карпухина // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 2015. - № 2. – С. 20-23.

14. Степанова, Т. Ф. Структура и некоторые биологические свойства грамотрицательных бактерий, составляющих микросимбиоценоз переднежаберных моллюсков – битинийд. Сообщение 2 / Т. Ф. Степанова, О. В. Бухарин, Л. В. Катаева, Н. Б. Перунова, Н. Ф. Карпухина, А. А. Вакарина // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 2015. - № 2. – С. 23-27.

15. Вакарина, А. А. Рациональные аспекты использования бактериофагов / А. А. Вакарина, Л. В. Катаева, Н. Ф. Карпухина // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2015. - № 5. – С. 76-79.

16. Бухарин, О. В. Штаммоспецифичность белкового профиля представителей рода *Bifidobacterium* / О. В. Бухарин, Т. Ф. Степанова, Н. Б. Перунова, Е. В. Иванова, С. В. Андрищенко, Л. В. Катаева // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2015. - № 2. - С. 3-9.

17. Катаева, Л. В. Биологическая характеристика бактерий рода *Aeromonas*, выделенных из моллюсков – битинийд и водоема / Л. В. Катаева,

- Н. Б. Перунова, Н. Ф. Карпухина, Т. Ф. Степанова, О. В. Бухарин // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2015. - № 4. – С. 236-239.
18. Степанова, Т. Ф. Биологические свойства бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, входящих в состав микросимбиоза первых промежуточных хозяев *O. felineus* / Т. Ф. Степанова, О. В. Бухарин, Л. В. Катаева, Н. Б. Перунова, Н. Ф. Карпухина // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 2015. - № 4. – С. 3-7.
19. Катаева, Л. В. Сравнительная характеристика микробиоценоза больных лямблиозом и воспалительными заболеваниями желудочно-кишечного тракта / Л. В. Катаева, В. В. Ташланова, К. Б. Степанова, Е. И. Швед // Итоги и перспективы изучения проблем инфекционных и паразитарных болезней: сб. трудов Российской науч.-практич. конф. в связи с 50-летием со дня организации Тюменского НИИ краевой инфекционной патологии, 24-25 сентября 2015 г. - Тюмень, 2015. - Т. 1. - С. 165-168.
20. Катаева, Л. В. Изучение микропаразитоценоза с позиции аспектов системного подхода / Л. В. Катаева // Итоги и перспективы изучения проблем инфекционных и паразитарных болезней: сб. трудов Российской науч.-практич. конф. в связи с 50-летием со дня организации Тюменского НИИ краевой инфекционной патологии, 24-25 сентября 2015 г. - Тюмень, 2015. - Т. 1. - С. 162-164.
21. Ташланова, В. В. Характеристика микробиоценоза толстого кишечника при лямблиозе у детей и взрослых / В. В. Ташланова, К. Б. Степанова, Л. В. Катаева, Е. И. Швед // Современные проблемы эпидемиологии и гигиены: Материалы VII Всеросс. науч.-практич. конф. молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора, 8-10 декабря 2015 г. - Санкт-Петербург, 2015. - С. 197-198.
22. Катаева, Л. В. Микропаразитоценоз первых промежуточных хозяев *Opisthorchis felineus* / Л. В. Катаева, Т. Ф. Степанова // Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями: Материалы докл. науч. конф.; 17-18 мая 2016 г. – Москва, 2016. – Вып. 17. – С. 199-202.
23. Катаева, Л. В. Микробиоценоз моллюсков битинид Обь-Иртышского и Амурского водных бассейнов / Л. В. Катаева, Е. С. Кряжева // Важнейшие вопросы инфекционных и паразитарных болезней: сб. науч. работ / ТНИИКИП. - Ижевск: ООО Принт-2. - 2016. - С. 47-54.
24. Степанова, Т.Ф. Структура микрофлоры производственной среды отделения реанимации и интенсивной терапии новорожденных Национального госпиталя педиатрии г. Ханой, СРВ / Т.Ф. Степанова, Л. В. Катаева, А.П. Ребещенко, Le Thanh Hai, Khu Thi Khanh Dung, О. В. Посоюзных, А. Н. Кузнецов, Le Thi Minh Huong, Tran Thi Nhai // Здоровье населения и среда обитания. – 2017. - № 11 (296). – С. 53-56.
25. Катаева, Л. В. К вопросу распространения бактерий рода *Aeromonas* в объектах окружающей среды и клиническом материале / Л. В. Катаева, Т.Ф. Степанова, О. В. Посоюзных, В. В. Ташланова, Н. Ф. Карпухина, О. Н. Колотова, Л. А. Бычкова // Здоровье населения и среда обитания. – 2018. - № 6 (303). – С. 54-57.

26. **Катаева, Л. В.** Сезонная динамика микропаразитоценоза первых промежуточных хозяев *Opisthorchis felineus* / **Л. В. Катаева**, Т. Ф. Степанова, Н. Ф. Карпухина // Важнейшие вопросы инфекционных и паразитарных болезней: сб. науч. работ / ТНИИКИП. - Ижевск: ООО «Принт». - 2018. - С. 52-56.
27. **Катаева, Л. В.** Бактерии семейств *Enterobacteriaceae* и *Bacillaceae* – компоненты микросимбиоза первых промежуточных хозяев *O. felineus* / **Л. В. Катаева**, Т. Ф. Степанова, Н. Ф. Карпухина, А. А. Вакарина // Важнейшие вопросы инфекционных и паразитарных болезней. Шестой сборник научных работ / колл. авт. - Ижевск: ООО «Принт». - 2018. - С. 57-63.
28. **Катаева, Л. В.** Микробиоценоз кишечного содержимого рыб, пораженных личинками возбудителя *Opisthorchis felineus* / **Л. В. Катаева**, М. И. Беляева, Т. Ф. Степанова, О. В. Посоюзных, Д. В. Некрасова, О. Н. Колотова // Материалы IV национального конгресса бактериологов и международного симпозиума «Микроорганизмы и биосфера «MICROBIOS-2018», 12-13 сентября 2018 г. - Омск, 2018. - С. 34-35.
29. **Катаева, Л. В.** Зараженность личинками биогельминтов рыб из водоемов гиперэндемического очага описторхоза и характеристика их микробиоценоза / **Л. В. Катаева**, М. И. Беляева, Т. Ф. Степанова, О. В. Посоюзных, О. Н. Колотова // Важнейшие вопросы инфекционных и паразитарных болезней. Шестой сборник научных работ / колл. авт. - Ижевск: ООО «Принт». - 2018. - С. 44-47.
30. **Ребещенко, А. П.** Микробиота объектов среды и слизистых оболочек верхних дыхательных путей пациентов инфекционного отделения Национального госпиталя педиатрии г. Ханой, Вьетнам // **А. П. Ребещенко**, **Л. В. Катаева**, Т. Ф. Степанова, **Le Thanh Hai, Khu Thi Khanh Dung, О. В. Посоюзных, Le Thi Minh Huong, Tran Thi Nhai** // Здоровье населения и среда обитания. – 2019. - № 1 (310). – С. 51-54.
31. **Катаева, Л. В.** Анализ результатов санитарно-бактериологических исследований объектов окружающей среды и пищевых продуктов / **Л. В. Катаева**, А. А. Вакарина, О. В. Посоюзных, Т. Ф. Степанова, О. Н. Колотова, И. И. Кошкарева // Материалы V Национального конгресса микробиологов, 16-17 сентября 2019 г. – Москва, 2019. – С. 36.
32. **Катаева, Л. В.** Характеристика генов вирулентности штаммов *Escherichia coli*, изолированных от больных хроническими воспалительными заболеваниями желудочно-кишечного тракта / **Л. В. Катаева**, Т. Ф. Степанова, А. А. Кисличкина, А. Г. Богун, А. А. Вакарина // Материалы V Национального конгресса микробиологов, 16-17 сентября 2019 г. – Москва, 2019. – С. 36-37.
33. **Вакарина, А. А.** Влияние бактериофагов на чувствительность условно-патогенных бактерий к антибактериальным препаратам / **А. А. Вакарина**, **Л. В. Катаева**, Т. Ф. Степанова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2019.- №2. – С. 3-7.
34. **Катаева, Л. В.** Возрастные особенности видового разнообразия лактобацилл толстого кишечника у жителей Тюмени / **Л. В. Катаева**, А. А. Вакарина, О. Н. Колотова, О. В. Посоюзных, В. В. Ташланова, Н. Ф. Карпухина, Л. А. Бычкова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2019. - №3. - С. 10-15.

35. Катаева, Л. В. Сравнительная характеристика микрофлоры пациентов различных отделений Национального госпиталя педиатрии г. Ханой (Вьетнам) // Л. В. Катаева, А. П. Ребещенко, Т. Ф. Степанова, О. В. Посоюзных, Le Thanh Hai, Le Thi Minh Huong // Здоровье населения и среда обитания. – 2019. - №3 (312). – С. 43-48.
36. Катаева, Л. В. Характеристика генов вирулентности штаммов *Escherichia coli*. Обзор литературы / Л. В. Катаева, Т. Ф. Степанова, В. В. Мефодьев // Важнейшие вопросы инфекционных и паразитарных болезней: седьмой сборник научных работ / Тюмен. науч.-исслед. ин-т краевой инфекц. патологии. - Тюмень, 2019. - С. 101-107.
37. Катаева, Л. В. Протеомный анализ штаммов бактерий рода *Aeromonas*, изолированных из объектов окружающей среды / Л. В. Катаева, О. Н. Колотова, М. И. Беляева, Т. Ф. Степанова // Важнейшие вопросы инфекционных и паразитарных болезней: седьмой сборник научных работ / Тюмен. науч.-исслед. ин-т краевой инфекц. патологии. - Тюмень, 2019. - С. 95-100.
38. Катаева, Л. В. Взаимосвязь дисбиотических нарушений содержимого толстого кишечника и иммунологических показателей при хроническом описторхозе / Л. В. Катаева, Н. Ф. Карпухина, А. А. Вакарина, Л. В. Курлаева, Т. Ф. Степанова, К. Б. Степанова // Важнейшие вопросы инфекционных и паразитарных болезней: Седьмой сборник научных работ. – Ижевск: ООО «Принт». - 2019. – С. 89-94.
39. Катаева, Л. В. Идентификация источника заражения и расшифровка вспышки, вызванной *Salmonella enteritidis*, методом масс-спектрометрии / Л. В. Катаева, О. Н. Колотова, А. А. Вакарина, Т. Ф. Степанова // Материалы научно-практических конференций в рамках V Российского конгресса лабораторной медицины (РКЛМ 2019), 11-13 сентября 2019 г. – Москва, 2019. - С. 144.
40. Катаева, Л. В. Молекулярно-генетические методы в санитарно-бактериологических исследованиях пищевых продуктов / Л. В. Катаева, А. А. Вакарина, И. В., Бакштановская, Т. Ф. Степанова, Е. А. Зматракова, И. В. Ожирельева, И. И. Кошкарева // Молекулярная диагностика и биобезопасность – 2020. Сборник материалов. - Москва, 2020. - С. 105.
41. Катаева, Л. В. Оценка протеинограмм штаммов бактерий рода *Aeromonas*, изолированных из объектов окружающей среды и биологического материала / Л. В. Катаева, Т. Ф. Степанова, О. Н. Колотова, М. И. Беляева // Молекулярная диагностика и биобезопасность – 2020. Сборник материалов. – Москва, 2020. - С. 106.
42. Катаева, Л. В. Молекулярно-генетическая характеристика резистентности штаммов *Acinetobacter baumannii*, изолированных из биологических и почвенных образцов / Л. В. Катаева, Т. Ф. Степанова, О. Н. Колотова, А. А. Вакарина // Молекулярная диагностика и биобезопасность – 2020. Сборник материалов. - Москва, 2020. - С. 129.

ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Патент 2545707 Российская Федерация. МПК G01N 33/48. Способ определения границ природных очагов биогельминтозов / Ожирельев В. В., Степанова Т. Ф., Ушаков А. В., Степанова К. Б., Катаева Л. В., заявитель и

патентообладатель: Федеральное бюджетное учреждение науки «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (RU) - № 2013142977/15; заявл. 20.09.2013; опубл. 10.04.2015. Бюл. № 10. – 14 с.

2. Патент 2662930 Российская Федерация. МПК C12Q 1/6806. Система мониторинга патогенного потенциала энтеробактерий методом полимеразной цепной реакции: патент / Андриюшенко С. В., Здвижкова И. А., Перунова Н. Б., Бухарин О. В., Котова Е. В., Степанова Т. Ф., **Катаева Л. В.**, заявитель и патентообладатель: ФГБУН «Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза» Уро РАН - № 2017119197/10 (033289); заявл. 01.06.2017; опубл. 31.07.2018. Бюл. № 22. – 2 с.

3. Патент 2696101 Российская Федерация. МПК G01N 33/483. Способ расшифровки вспышек бактериальных инфекций и определения источника заражения / **Катаева Л. В.**, Колотова О. Н., Степанова Т. Ф., заявитель и патентообладатель: Федеральное бюджетное учреждение науки «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (RU) - № 2018127230/04; заявл. 24.07.2018; опубл. 31.07.2019. Бюл. № 22. – 2 с.

4. Патент 2711922 Российская Федерация. МПК C12N 1/20; C12Q 1/18; C12R 1/01. Мультирезистентный штамм бактерий *Acinetobacter baumannii* для стандартизации оценки эффективности разрабатываемых антимикробных препаратов и дезинфицирующих средств / **Катаева Л. В.**, Колотова О. Н., Степанова Т. Ф., Богун А. Г., Кисличкина А. А., заявитель и патентообладатель: Федеральное бюджетное учреждение науки «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (RU) - № 2019119531; заявл. 21.06.2019; опубл. 23.01.2020. Бюл. № 3. – 2 с.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

УПМ – условно патогенные микроорганизмы

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

КОЕ – колониеобразующие единицы

АЛА – антилизоцимная активность

БПО – биопленкообразование

НГОБ – неферментирующие грамотрицательные бактерии

ИКБ – иксодовый клещевой боррелиоз

ETEC – энтеротоксигенные *E.coli*

EIEC – энтероинвазивные *E.coli*

ExPEC – внекишечные патогенные *E.coli*

E.coli (Lac-) – лактозонегативные *E.coli*

E.coli (Gem+) – гемолитические *E.coli*

air – enteroaggregative immunoglobulin repeat protein

eilA – Salmonella Hila homolog

pic – Serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae
sfaS – S-fimbriae minor subunit
iha – Adherence protein
lpfA – Long polar fimbriae
mchF – ABC transporter protein
iroN – Enterobactin siderophore receptor protein
ireA – Siderophore receptor
astA – EAST-1 heat-stable toxin
cnf – Cytotoxic necrotizing factor
vat – Vacuolating autotransporter toxin
sat – Secreted autotransporter toxin
senB – Plasmid-encoded enterotoxin
sigA – Shigella IgA-like protease homologue
mchB – Microcin H47 part of colicin H
mchC - MchC protein
mcmA - microcin M part of colicin H
cba – Colicin B
cma – Colicin M
selB – Endonuclease colicin E2
iss – increased serum survival
gad – dlutamate decarboxylase